RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 2 - Aprile 1955

SULLA NATURA DELL'ASSOCIAZIONE TRA *MACROCHELES MUSCAEDOMESTICAE* E *MUSCA DOMESTICA* (*)

ALESSANDRO FILIPPONI (**)

Introduzione

Tra gli acari trasportati dalle mosche, la specie più anticamente nota è, senza dubbio, *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli 1772). Tuttavia gli autori non sono sempre stati d'accordo circa la natura dei rapporti tra le due specie. Sebbene infatti la maggior parte degli acarologi, sia antichi che moderni, abbiano ritenuto che il macrochelide si serva della mosca unicamente come ospite di trasporto, non è mancato chi, al contrario, sospettasse (Canestrini 1882) o desse per certo (Ewing 1913; Zanini 1929) che l'associazione tra le due specie fosse di natura parassitaria. Il contrasto di opinione deriva dalle discordi vedute circa i rapporti anatomici tra il macrochelide e la mosca. Mentre i sostenitori della prima tesi affermano che l'acaro si sostenga afferrandosi, mediante i cheliceri, ad una setola dell'ospite trasportatore (Vitzthum 1943; Pereira e De Castro 1945), per gli altri i rapporti anatomici sono più intimi. Canestrini G. e R. (1882), ad esempio, riferendosi, in genere, ai *Gamasides*, osservavano che «è difficile dire se succhiano anche l'ospite che li porta, perchè milita in favore il fatto che si vedono spesso fortemente attaccati alle parti più delicate di esso». Più deciso assertore del parassitismo fu, da noi, Zanini (1923), il quale fu il primo a sostenere l'opportunità di utilizzare *M. muscaedomesticae* nella lotta contro le mosche. Peraltro l'autore non solo non riuscì a fornire prove convincenti del parassitismo delle femmine del macrochelide, ma cercò di confortare la sua tesi, prospettando l'eventualità che le larve esapode di *Microtrombidiinae*, che infestano gli adulti di *M. domestica*, rappresentassero gli stadi larvali di *M. muscaedomesticae*.

Pereira e De Castro (1945), nel corso di una accurata ricerca, intesa a chiarire la posizione sistematica ed il ciclo biologico di *M. muscaedomesticae*, riuscirono ad ottenere colture pure del macrochelide, utilizzando sterco di cavallo sterilizzato ed uova di mosche. Ne dedussero che *M. muscaedomesticae* è specie «tipicamente predadora, prefencialmente de ovos de moscas, eventualmente de larvas de moscas no 1° estádio, o que nos pareceu muito esporádico e portanto negligivel». La possibilità di un controllo biologico delle mosche da parte dell'acaro viene di nuovo prospettata, ma per motivi del tutto diversi da quelli supposti da Zanini.

(*) *Il presente lavoro rientra nel piano di ricerche sulla mosca domestica concordato fra la Fondazione Rockefeller e l'Istituto Superiore di Sanità.*

(**) *Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di parassitologia. Roma.*

Le osservazioni di Pereira e De Castro, rivelando un nuovo aspetto dei rapporti tra macrochelide e mosche, assumono, a mio avviso, un'importanza di assai più vaste proporzioni. Esiste, come è noto, tutta una serie di acari della tribù *Gamasides* che coabitano lo stesso biotopo, sterco di animali domestici, unitamente a stadi larvali di mosche e di altri ditteri di importanza medica. Se i *Gamasides* fimicoli, contrariamente a quanto pretese aver dimostrato Canestrini (1881), risultassero tutti creofagi e predatori, inserendosi all'ultimo anello della catena trofica della biocenosi di un letamaio, si porrebbero di conseguenza alcuni problemi, la cui importanza pratica, oltre che teorica, non può sfuggire ad alcuno. Che grado di specializzazione assume la predazione? Qual'è la capacità di offesa di ciascuna specie? Quali sono le possibilità di difesa da parte di ditteri di interesse medico? Quali spostamenti negli equilibri biologici tra queste diverse specie possono essere determinate dal massiccio impiego di insetticidi nella lotta contro gli insetti domestici?

Con questa prima nota, in cui si indaga sperimentalmente la natura dei rapporti tra femmine di *M. muscaedomesticae* ed i rappresentanti di ciascuno stadio di *M. domestica*, si intende iniziare una serie di ricerche il cui scopo precipuo è quello di precisare l'eventuale importanza dei *Gamasides* fimicoli nel controllo biologico di ditteri di interesse medico.

La tecnica usata, la natura del materiale impiegato e la metodologia statistica adottata nella elaborazione dei dati verranno indicate, per comodità di esposizione, nella descrizione dei singoli esperimenti.

Rapporti tra « M. muscaedomesticae » e uova di mosche

In una prima esperienza 6 gruppi di 50 uova di *M. domestica* furono posti in comuni vasetti patologici (8 cm × 5,5 cm), a tre dei quali furono aggiunte 10 femmine di *M. muscaedomesticae*.

Per la raccolta delle uova si era operato nella seguente maniera. Gruppi di circa 300 pupe di mosche, provenienti dagli allevamenti di massa del nostro insettario, erano state fatte sfarfallare in gabbiette di tulle (21 cm × 20 cm × 12 cm) e gli adulti furono alimentati con zucchero e latte. Al 4° giorno si introdussero nelle gabbie bicchierini con ovatta imbevuta di latte, per le ovodeposizioni, prelevandoli dopo 3 ore. Le uova, raccolte con pennellino, furono adagiate su un quadrettino di carta bibula umido e introdotte nei vasetti, in cui preventivamente era stato posto un cilindro di carta del diametro di base di 3 cm, ottenuto arrotolando un rettangolo di carta (25 cm × 4 cm), leggermente bagnato. Le femmine del macrochelide erano state catturate su mosche 4 giorni prima e mantenute a digiuno per 3 giorni. L'esperienza fu eseguita in camera termostatica a 25°. Gli acari furono rimossi dopo 2 ore di contatto. La mattina seguente si esaminò ciascun vasetto per la conta delle larve schiuse.

Non appena introdotte, le femmine di *M. muscaedomesticae* si orientano decisamente verso le uova ed iniziano ad aggredire. I risultati della predazione sono esposti nella tabella 1. All'interno di ciascuna serie, quella con acari e quella senza acari, è stato calcolato il chi quadrato con il metodo di Brandt e Snedecor, per controllare l'omogeneità delle condizioni sperimentali. Per la valutazione delle differenze tra le due serie, si è calcolato il chi quadrato sulla tabella a quattro quadranti, ottenuta con i totali delle due serie, valendosi della correzione di Yates.

Non tutte le uova nei controlli sono schiuse. Accanto ad uova bianche ed omogenee, ve ne erano altre imbrunite e con abbozzi di embrione in stadio più

TABELLA 1

Numero di larve schiuse da 3 gruppi di 50 uova di M. domestica *tenute a contatto per 2 ore, a 25°, con 10 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 3 giorni, e da 3 gruppi di controllo.*

Serie	Uova nel gruppo	Sopravvissute	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Con acari . . .	50	4	0,0800		
	50	2	0,0400		
	50	7	0,1400		
	150	13		3,19	0,20
Senza acari . . .	50	38	0,7600		
	50	32	0,6400		
	50	27	0,5400		
	150	97		5,30	0,08
Per le differenze tra le due serie				98,89	< 0,01

TABELLA 2

Numero di larve schiuse da 3 gruppi di 100 *uova di* M. domestica, *tenute a contatto per 9 ore, a 25°, con 10 femmine di* M. muscaedomesticae, *poche ore dopo la loro cattura su mosche, e da 3 gruppi di controllo.*

Serie	Uova nel gruppo	Sopravvissute	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Con acari . . .	100	10	0,1000		
	100	28	0,2800		
	100	23	0,2300		
	300	61		10,67	< 0,01
Senza acari . . .	100	86	0,8600		
	100	90	0,9000		
	100	84	0,8400		
	300	260		1,54	0,47
Per le differenze tra le due serie				131,32	< 0,01

o meno avanzato di sviluppo. E' probabile che, oltre ad embrioni morti per la presenza di fattori letali, vi fosse qualche uovo non fecondato. La probabilità di sopravvivenza comunque, in ciascuna delle due serie, non si scosta dalle variazioni accidentali, prevedibili in campionature effettuate su una popopolazione omogenea. Le differenze tra le due serie, al contrario, sono così marcate da non lasciar dubbi circa la loro appartenenza a due distinte popolazioni.

In una seconda esperienza, utilizzando lo stesso tipo di vasetti, 3 gruppi di 100 uova di mosca furono messe a contatto per 9 ore con 10 femmine di *M.muscaedomesticae,* un paio d'ore circa dopo la loro cattura. Altri 3 gruppi di 100 uova furono poste in vasetti senza acari, per controllo.

I dati sono riprodotti nella tabella 2. La probabilità di sopravvivenza nei controlli appaiono omogenee; non così quelle della prima serie. C'è dunque da supporre una certa eterogeneità da parte della capacità di offesa degli acari, che potrebbe essere attribuita ad un diverso grado di affamamento. In ogni caso le divergenze tra le due serie risultano nettissime.

Con una terza esperienza si è voluto infine valutare la capacità, da parte del macrochelide, di predare uova di mosche in ambiente più vasto ed in condizioni di più difficile individuazione.

In 6 beker da 600 cc furono messi 500 cc circa di un terreno colturale, usato nel nostro laboratorio per l'allevamento delle mosche (crusca di grano, latte in polvere e acqua nei rapporti 1000 : 120 : 2000, cui vengono aggiunti 30 cc di una soluzione alcoolica di nipagina al 10%). In ciascun beker furono deposte 300 uova di mosche, ricoprendole con un nuovo strato di terreno dello spessore di circa 1 cm. In ciascuno dei primi 3 beker furono aggiunte 20 femmine di *M. muscaedomesticae,* a digiuno da 2 giorni. Infine tutti i beker furono coperti da un velo di rhodia, con maglia molto fitta, tenuto aderente con elastico. I risultati dell'esperienza furono valutati dal numero di adulti sfarfallati da ogni terreno colturale e sono riportati nella tabella 3.

Esiste, questa volta, un certo grado di eterogeneità nelle probabilità di sopravvivenza, per entrambe le serie. Un confronto con i risultati della tabella 5, relativi ad una analoga esperienza con larve di 1° stadio, induce ad escludere che possa chiamarsi in causa una inomogeneità nelle condizioni dei terreni culturali o nelle nuove cause di variazione che intervengono in questo tipo di esperienza: competizione, mortalità nei vari stadi di sviluppo della mosca, fecondità e fertilità del macrochelide, ecc.. Con ogni verisimiglianza si tratta solo di eterogeneità, non eccessiva del resto, nella schiudibilità delle uova, dovuta al fatto che esse provenivano da gabbie diverse e che, nel timore di non raggiungere il numero prefisso di uova per coltura (dalla pratica del nostro insettario 300 uova risultavano costituire un grado ottimale di affollamento per quel tipo di coltura), si rinunciò ad una distribuzione casuale delle uova tra le varie colture. Vale a dire le prime 300 uova contate furono destinate alla prima coltura, le seconde 300 alla seconda e così via. Ciò non ostante la significatività delle differenze tra le due serie non lascia dubbi neppure in quest'ultima esperienza.

TABELLA 3

Numero di adulti ottenuti da 3 gruppi di 300 uova di M. domestica *poste in terreni colturali in cui erano state immesse 20 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 2 giorni, e da 3 gruppi di controllo.*

Serie	Uova nel gruppo	Sopravvissute	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Con acari	300	28	0,0933		
	300	53	0,1766		
	300	31	0,1033		
	900	112		11,40	< 0,01
Senza acari	300	140	0,4667		
	300	111	0,3700		
	300	164	0,5467		
	900	415		18,95	< 0,01
Per le differenze tra le due serie				244,70	< 0,01

Concludendo, femmine di *M. muscaedomesticae,* poste a contatto con uova di *M. domestica,* vi si orientano rapidamente, aggredendole attivamente. Ciò è deducibile dalla osservazione diretta ed è confermato dai risultati dell'indagine statistica. Risulta inoltre provato che le femmine del macroschelide sono capaci di rintracciare e predare uova di mosche, immerse in un terreno colturale. Dalle tre esperienze è possibile infine ricavare qualche dato orientativo circa la capacità di offesa della specie predatrice. Nella prima esperienza risultano mancanti 4,6 larve di mosca per ogni femmina di *M. muscaedomesticae.* Ammettendo che, come nel controllo, la mortalità complessiva per altre cause assommi a 53 individui, la distruzione di uova dovuta alla predazione è pari a 2,8 per predatore. Ma poichè è ovvio che anche le uova non fecondate o abortite possono essere state predate dal macrochelide, il numero di uova distrutto da ogni predatore, in 2 ore, nelle condizioni dell'esperimento, può ritenersi compreso tra 2,8 e 4,6. Il numero di uova distrutto da ogni predatore, nelle condizioni della seconda esperienza, è compreso tra 6,6 e 7,9. Nel caso della terza esperienza, un simile computo non è possibile. Anzitutto le femmine del macrochelide in presenza di uova di mosche, iniziano a riprodursi; inoltre, come si dimostrerà appresso, anche altri stadi del ciclo di sviluppo della mosca sono soggetti a predazione. La perdita totale nei controlli è stata del 53,89%: la perdita totale nella serie con acari è stata dell'87,56%: la presenza di 20 fem-

mine di *M. muscaedomesticae* nei terreni colturali ha quindi introdotto una causa di mortalità che ha influito per circa il 44% sulla mortalità totale, vale a dire, le perdite dovute alla predazione sono di poco inferiori a quelle addebitabili al complesso di tutte le altre cause di mortalità insieme considerate.

Rapporti tra « M. muscaedomesticae » e larve di mosca del 1° stadio

Con le larve del 1° stadio sono state eseguite 2 esperienze in tutto equivalenti alla prima e alla terza del paragrafo precedente.

In 5 gabbiette di mosche già mature, di provenienza identica a quelle utilizzate nelle esperienze già descritte, si ponevano bicchierini per ovodeposizione, la sera prima, togliendoli dopo 2-3 ore. Divisi in 3 gruppi, i bicchierini con le uova pernottavano in 3 diversi termostati, a 30°, a 25° e a 20°. La mattina seguente si sceglievano i bicchierini in cui le larve stavano schiudendo. Preparati 6 vasetti patologici con cilindro di carta bibula, vi furono immesse 50 larve ciascuno, aggiungendo a 3 di essi 10 femmine di *M. muscaedomesticae*, a digiuno da 2 giorni, che furono tolte dopo due ore di permanenza. La conta delle larve sopravvissute e divorate fu eseguita immediatamente dopo.

I risultati dell'esperienza appaiono nella tabella 4. La sopravvivenza nei controlli è totale. Le probabilità di sopravvivenza nella prima serie sono così evidentemente omogenee, da renderne superfluo un controllo statistico. Poichè nella tabella a quattro quadranti, risultante dalle frequenze totali appare una frequenza eguale a zero, la valutazione della significatività delle differenze tra le due serie è stata effettuata mediante il test fattoriale di Fischer, ottenendo un valore fortemente significativo.

Tabella 4

Numero di sopravvissuti in 3 gruppi di 50 larve del 1° stadio di M. domestica, *tenute a contatto per 2 ore, a 25°, con 10 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 2 giorni, ed in 3 gruppi di controllo.*

Serie	Sopravvissute nei 3 gruppi				
		X		*SX*	*P*
Con acari . .	24	23	25	72	
Senza acari . .	50	50	50	150	
Totale				222	
Per la differenza tra le due serie (test fattoriale di Fischer)					34.10^{-31}

TABELLA 5

Numero di adulti ottenuti da 3 gruppi di 300 larve di 1° stadio di M. domestica, *poste in terreni colturali in cui erano state immesse 20 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 2 giorni, e da 3 gruppi di controllo.*

Serie	Larve 1° nel gruppo	Sopravvissute	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Senza acari	300	72	0,2400		
	300	54	0,1800		
	300	75	0,2500		
	900	201		5,00	0,08
Con acari	300	134	0,4467		
	300	160	0,5333		
	300	170	0,5667		
	900	464		9,15	0,01
Per le differenze tra le due serie				163,70	< 0,01

I dati della tabella 5 si riferiscono ad una esperienza completamente analoga a quella della tabella 3. Invece delle uova, si posero nei terreni colturali larve di 1° stadio. Si noti la maggiore omogeneità, all'interno delle serie, nei confronti della esperienza della tabella 3 e la significativa divergenza tra le due serie.

Come è stato sopra riferito, secondo PEREIRA e DE CASTRO (1945), l'azione predatrice di *M. muscaedomesticae* nei confronti di larve di 1° stadio sarebbe trascurabile. Le conclusioni deducibili da queste esperienze non confermano tale veduta. Ogni femmina del macrochelide ha qui distrutto, in media, in 2 ore, 2,6 larve (tabella 4) contro 2,8-4,6 uova dell'esperienza corrispondente (tabella 1). Nelle prove su terreni colturali, con l'introduzione di 20 femmine dell'acaro, si ha un aumento di perdita pari al 29%, contro un aumento di perdita del 44% della corrispondente esperienza con uova. Vale a dire, l'effetto della predazione su larve di 1° stadio è solo di poco inferiore a quello sulle uova ed è tutt'altro che trascurabile. Dall'impressione che se ne trae dall'osservazione diretta, parrebbe che la capacità di offesa da parte del predatore non sia affatto diminuita; esiste se mai da parte della vittima, una certa possibilità di difesa, che è nulla nel caso delle uova, dovuta alla mobilità della larva.

Per controllare più da vicino il comportamento del predatore si è ricorso al seguente espediente. Quattro larve di 1° stadio, appena sgusciate dall'uovo,

venivano poste in una salierina insieme ad una femmina di *M. muscaedomesticae*, ricoprendo con vetrino. L'osservazione veniva effettuata al binoculare da dissezione, con diversi ingrandimenti rapidamente intercambiabili. Il predatore inizia a correre convulsamente per la salierina. Tenta reiteratamente di uscirne, forzando con il primo paio di zampe, che funge, come è noto, da organo tattile, il coprioggetto al margine della salierina. Successivamente desiste e rallenta il moto. Imbattendosi in una larva, s'arresta, retrocede alquanto, agitando continuamente il primo paio di zampe, e poi, con balzo repentino, s'avventa sulla preda, afferrandola con le chele dei cheliceri. La larva si contrae contorcendosi ed a volte riesce a sfuggire alla presa. In tal caso o il predatore desiste o ritorna in guardia. Se la presa è salda, per la larva non c'è più scampo. Le sue contrazioni diminuiscono d'intensità, finchè, una volta che l'acaro ha perforato l'esoscheletro, si distende afflosciata. Il predatore inizia allora a divorarla. Con esemplari a digiuno da 10 giorni ho visto la larva svuotarsi in un minuto circa, mentre l'idiosoma dell'acaro si gonfiava fino all'inverosimile.

E' capitato più volte che la larva si muovesse sul vetrino e poichè le larve del primo stadio sono piuttosto trasparenti, è stato possibile seguire in parte l'attività di alcune appendici del predatore. La preda una volta immobilizzata, è tenuta ferma con l'aiuto delle zampe ambulatorie oltre che del primo paio. I cheliceri vengono estroflessi alternativamente, mentre il dito mobile della chela viene divaricato e serrato. Il movimento richiama quello delle mani di un mungitore, ma è rapidissimo. Se il tessuto resiste, i cheliceri sono estroflessi contemporaneamente: il tessuto, afferrato dalle due chele, viene allora dilacerato con moto di sfregamento, o strappato con moto di abduzione dei cheliceri. Il fatto è evidentissimo quando le chele raggiungono i due tronchi tracheali della larva. Al trituramento dei tessuti della vittima contribuiscono verisimilmente anche i cornicoli mascellari, mentre forse l'attività principale delle lacinie e del labro è quella di convogliare alla cavità orale i tessuti tritati. Ma sull'attività di queste parti non è possibile un controllo diretto.

Secondo G. e R. Canestrini (1882), « sarebbe in errore colui che credesse che i gamasi divorino altri piccoli animali, mentre invece non fanno che succhiarli ». Dalle osservazioni, sia pure incomplete, ora riferite si potrebbe essere autorizzati a pensare il contrario, almeno per quanto riguarda la specie in esame. Il termine « succhiare » riferito all'attività dell'apparato boccale di un macrochelide, è usato correntemente dagli autori, ma, a mio avviso, è molto improprio. La morfologia ed il movimento delle varie parti dell'apparato boccale fa pensare piuttosto ad un apparato boccale trituratore, che non succhiatore.

Rapporti tra « M. muscaedomesticae » e larve del 2° stadio

Sei gruppi di 10 larve di 2° stadio furono introdotte nei soliti vasetti patologici, preparati nella stessa maniera. A 3 di essi furono aggiunte 11 femmine di *M. muscaedomesticae*, tenute preventivamente a digiuno per 8 giorni. I predatori furono tolti dopo 5 ore di contatto.

Tabella 6

Numero di sopravvissuti in 3 gruppi di 10 larve del 2° stadio di M. domestica, *tenute a contatto per 5 ore, a 25°, con 11 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 8 giorni, ed in 3 gruppi di controllo.*

Serie	Sopravvissute nei 3 gruppi				
		X		*SX*	*P*
Con acari . . .	3	2	1	6	
Senza acari . . .	10	10	10	30	
Totale				36	
Per la differenza tra le due serie (test fattoriale di Fischer)					16.10^{-12}

I risultati della predazione sono ricordati nella tabella 6. Le differenze tra le due serie sono state valutate, come nel caso della tabella 4, mediante il test fattoriale di Fischer. La capacità distruttiva del predatore risulta ancora una volta evidentissima.

La ricerca della preda da parte dell'acaro appare, all'osservazione diretta, attivissima. E' peraltro diminuita la probabilità degli esiti favorevoli, sia per la maggiore mobilità della larva, sia per l'aumentato indurimento dell'esoscheletro. Il numero medio di larve distrutte da ogni predatore, non ostante l'affamamento e le 5 ore di contatto è disceso a 0,78. Tale valore peraltro è tutt'altro che trascurabile, tenuto conto della mole maggiore raggiunta dalla larva.

Rapporti tra « M. muscaedomesticae » e larve del 3° stadio

Dopo i risultati precedentemente ottenuti, era ovvio indagare se le larve di mosche, raggiunto il 3° stadio non fossero, per caso, ancora soggette al pericolo di divenire preda del macrochelide.

Servendomi sempre degli stessi dispositivi, 3 gruppi di 5 larve di 3° stadio furono messi in presenza di 10 femmine di *M. muscaedomesticae*, a digiuno da 3 giorni; mentre altri 3 gruppi di 5 larve, per controllo, erano mantenuti in

vasetti contenenti solo il cilindro di carta bibula umido. L'osservazione fu protratta, finchè nel controllo non morì la prima larva.

TABELLA 7

Numero di sopravvissuti, dopo varie ore dall'inizio dell'esperienza, in 3 gruppi di 5 larve di 3° stadio di M. domestica *in presenza di 10 femmine di* M. muscaedomesticae, *a digiuno da 3 giorni, a 25°, ed in 3 gruppi di controllo.*

Ore	Sopravvissute nei 3 gruppi con acari				Sopravvissute nei 3 gruppi e senza acari			
			x	*SX*			*x*	*SX*
0	5	5	5	15	5	5	5	15
5	5	4	5	14	5	5	5	15
19	4	4	5	13	5	5	5	15
29	3	4	4	11	5	4	5	14

Per le prime 4 ore (tabella 7) tutte le larve, in entrambe le serie, sopravvissero. I predatori dopo reiterati tentativi di aggressione desistevano. La responsabilità sembra doversi attribuire prevalentemente alla rapidità di movimento della larva. I macrochelidi inseguono la larva, evitando di fronteggiarla; ma, come si arrestano in posizione di guardia, la larva ha già fatto un ulteriore scatto, assumendo nuova posizione, e il predatore rinuncia all'assalto. Alla 5ª ora nel vasetto 2 una prima larva è aggredita e tutti i macrochelidi presenti accorrono a divorarla. Alla 19ª ora anche nel vasetto 1 una prima larva soccombe e viene divorata, mentre tutte le larve dei controlli sono ancora vive. Infine alla 29ª ora dell'esperimento, nella serie con acari risultano uccise e più o meno completamente divorate 4 larve, mentre solo una larva è morta nei controlli.

Il confronto statistico tra le due serie, che per brevità non si riporta, non ci garantisce questa volta che le divergenze tra il numero dei sopravvissuti nelle due serie, non possano attribuirsi a variazioni accidentali. Ciò dipende evidentemente dallo scarso numero di larve utilizzate in questo esperimento, in mancanza di un congruo numero di predatori disponibili. Peraltro, tenendo conto della mole raggiunta dalla larva, i fatti direttamente osservati non lasciano dubbi circa la capacità, sia pure limitata, da parte del macrochelide di predare larve di 3° stadio.

Dai risultati di questa esperienza si potrebbe dedurre che la possibilità di cadere preda del macrochelide, da parte di una larva di 3° stadio sia subordinata ad un certo grado di debilitazione della larva stessa, dovuta, nel nostro caso, al digiuno. Va però notato che nell'ambiente naturale il movimento della larva non è altrettanto rapido e continuo, come nel vasetto, venendo così a ridursi uno dei principali mezzi di difesa. Nelle esperienze con

terreni colturali, di cui alle tabelle 3 e 5, le femmine del macrochelide introdotte ed i figli che ne sono nati, ad un certo momento, ovviamente, avevano a disposizione solo larve di 3° stadio. Attraverso il vetro del beker si è potuto osservare, più di una volta, l'aggressione da parte di acari a larve di 3° stadio che apparivano validissime. Anche in questo caso, una volta che un predatore riusciva a perforare l'esoscheletro della larva, altri ne accorrevano, in breve tempo, a contendersi la preda.

Rapporti tra « M. muscaedomesticae » e adulti di mosca

Allo scopo di decidere circa la natura dei rapporti tra macrochelide e adulti di mosca, si è tentato anzitutto una prova diretta.

Fu allestita una batteria di beker da 600 cc, divisa in 3 serie di 5 beker ciascuna. Nella prima serie, furono introdotti per ogni beker 10 maschi di un mutante di *M. domestica*, sfarfallati nell'intervallo di un'ora. Nella seconda serie si introdussero per ogni beker 50 femmine di *M. muscaedomesticae*, destinate a restare a digiuno. Nella terza serie di ogni beker si posero 10 maschi di mosca, fratelli e coetanei dei precedenti, e 30 femmine del macrochelide. Gli acari provenivano da un gruppo di circa 300 femmine, catturate nello stesso giorno su mosche, presso gli stabulari del nostro istituto, e furono distribuiti a caso nei 10 beker. Tutti i beker furono ricoperti con veli di rhodia dello stesso tessuto e al di sopra del velo furono adagiate due zollette di zucchero ed un batufolo di ovatta umido che ogni giorno veniva rinnovato.

Essendo i macrochelidi meno sensibili delle mosche all'azione dell'etere, nella terza serie, si erano quasi tutti attaccati alle mosche, prima che queste si riavessero dalla anestesia. Il numero di acari complessivamente attaccati alle 10 mosche di ciascun beker furono annotati giornalmente e sono ricordati nella tabella 12. Accanto alle frequenze giornaliere sono riportati nella tabella le frequenze cumulate che rappresentano il numero complessivo di giornate di associazioni sopportate da ogni gruppo di mosche fino a quel giorno.

Il criterio seguito nell'impostazione dell'esperienza era il seguente. Se i rapporti tra macrochelide e mosca adulto fossero stati di natura parassitaria, sarebbe dovuto risultare un danno per l'ospite ed un vantaggio per il parassita. Gli acari della terza serie, avendo a disposizione gli ospiti su cui nutrirsi, si sarebbero dovuti trovare in condizione di vantaggio nei confronti di quelli della seconda serie che si trovavano invece a digiuno (com'era prevedibile, lo zucchero posto sul velo di rhodia, per rendere al massimo omogenee le condizioni dell'esperimento, non venne affatto utilizzato dagli acari che preferivano restar concentrati sotto l'ovatta, in corrispondenza della maggiore umidità). D'altro canto le mosche della terza serie, sottoposte ad un'azione parassitaria, si sarebbero dovute trovare in condizioni di svantaggio nei confronti delle mosche della prima serie, del tutto indenni.

Per la misura del danno subito e del vantaggio ricevuto si è assunta, per ambo i membri dell'associazione, una stessa caratteristica biologica, la longe-

vità. Tale scelta apparirà giustificata, in questo caso, solo che si tenga presente i rapporti di mole e di numero tra parassiti e ospiti, la delicatezza dell'ospite e la rilevante azione distruggitrice dell'acaro, dimostrata dalle esperienze precedenti, ed, infine, la durata dell'associazione.

Il numero di sopravvissuti fu annotato giornalmente su 4 distinte tavole di sopravvivenza che qui, per brevità, non sono riprodotte. Con i valori cumulati dei 5 gruppi sono state compilate le curve di sopravvivenza del grafico 1 e 2, per dare un orientamento generale del fenomeno. Per una analisi statistica più accurata si rimanda invece alle tabelle 8 e 9, per la sopravvivenza delle mosche, e alle tabelle 10 e 11, per la sopravvivenza negli acari. In entrambi i casi, sono stati scelti 2 intervalli di tempo equidistanti (15 giorni per le mosche, 10 giorni per gli acari) e le probabilità di sopravvivenza, all'interno delle serie e tra le 2 serie sono state comparate con gli stessi criteri statistici precedentemente utilizzati, ad esempio, nella tabella 1.

Le conclusioni deducibili dal confronto statistico non lasciano perplessità: non esistono divergenze significative nella mortalità delle mosche; esistono invece differenze fortissime nella mortalità degli acari, ma a scapito e non a vantaggio della serie in associazione. Se si fossero scelti intervalli di tempo diversi, i risultati non sarebbero cambiati. La tesi del parassitismo non risulta quindi convalidata dalla esperienza effettuata.

La curva di sopravvivenza negli acari della seconda serie dimostra chiaramente la grande resistenza delle femmine di questa specie al digiuno, come successive esperienze confermarono. L'inattesa maggiore mortalità negli acari associati con mosche potrebbe avere due giustificazioni. E' verisimile anzitutto che il consumo energetico degli acari della terza serie sia stato assai maggiore che in quelli della seconda serie. Mentre questi infatti rimasero immobili, per la maggior parte del tempo, i primi, fossero essi attaccati o liberi, erano costretti ad un maggior dispendio di energie, dovendo nel primo caso sorreggersi, ed essendo, nel secondo caso, continuamente disturbati dalla pressochè continua agitazione delle mosche. Ma la causa più grave di mortalità è certamente un'altra. Le femmine del macrochelide non sopravvivono all'essiccamento che qualche giorno. Ora, mentre gli acari della seconda serie potevano scegliersi un ottimo di umidità, concentrandosi in corrispondenza dell'ovatta bagnata, per quelli della terza serie, una volta staccatisi dalle mosche, non era possibile sostarvi, essendo disturbati dalle visite continue delle mosche sopravvissute.

Per esaminare la natura dei rapporti anatomici si è proceduto nella seguente maniera:

Pupe di un mutante di *M. domestica*, facilmente riconoscibile (ocra) e prossime allo sfarfallamento, furono disseminate, il 20 novembre, sullo sterco di boxes con cavie in uno stabulario isolato del nostro istituto, all'interno del quale precedentemente si erano già più volte catturate mosche portanti femmine di *M. muscaedomesticae*

TABELLA 8

Numero di sopravvissuti in 5 gruppi di 10 maschi di M. domestica, *in associazione con 50 femmine di* M. muscaedomesticae, *ed in 5 gruppi di controllo, al 15° giorno di esperimento.*

Serie	Mosche nel gruppo *n*	Sopravvissute *X*	Probabilità sopravvivenza *p*	Chi quadrato	*P*
Con acari . .	10	5	0,5		
	10	8	0,8		
	10	8	0,8		
	10	5	0,5		
	10	8	0,8		
	50	34		4,96	0,29
Senza acari . .	10	4	0,4		
	10	7	0,7		
	10	5	0,5		
	10	8	0,8		
	10	7	0,7		
	50	31		4,58	0,34
Per le differenze tra le due serie				0,18	0,68

TABELLA 9

Come nella tabella 8, al 30° giorno di esperimento.

Serie	Mosche nel gruppo *n*	Sopravvissute *X*	Probabilità sopravvivenza *p*	Chi quadrato	*P*
Con acari . .	10	1	0,1		
	10	2	0,2		
	10	1	0,1		
	10	0	0,0		
	10	4	0,4		
	50	8		6,85	0,15
Senza acari . .	10	2	0,2		
	10	0	0,0		
	10	1	0,1		
	10	3	0,3		
	10	1	0,1		
	50	7		4,32	0,47
Per le differenze tra le due serie				0,00	100%

TABELLA 10

Numero di sopravvissuti in 5 gruppi di 50 femmine di M. muscaedomesticae, *in associazione con 10 maschi di* M. domestica, *ed in 5 gruppi di controllo a digiuno, al 10° giorno di esperimento.*

Serie	Acari nel gruppo	Sopravvissuti	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Con mosche . .	50	35	0,70		
	50	15	0,30		
	50	16	0,32		
	50	27	0,54		
	50	18	0,36		
	250	111		23,88	< 0,01
Senza mosche . . .	50	45	0,90		
	50	45	0,90		
	50	46	0,92		
	50	46	0,92		
	50	49	0,98		
	250	231		3,08	0,55
Per le differenze tra le due serie				131,03	< 0,01

TABELLA 11

Come nella tabella 10, *al* 20° *giorno di esperimento.*

Serie	Acari nel gruppo	Sopravvissuti	Probabilità sopravvivenza	Chi quadrato	
	n	*X*	*p*		*P*
Con mosche . .	50	3	0,06		
	50	1	0,02		
	50	0	0,00		
	50	2	0,04		
	50	2	0,04		
	250	8		3,35	0,50
Senza mosche .	50	42	0,84		
	50	41	0,82		
	50	40	0,80		
	50	39	0,78		
	50	47	0,94		
	250	209		7,12	0,14
Per le differenze tra le due serie				325,67	< 0,01

(nella prima quindicina di novembre si erano ottenuti campioni con una media massima di 5 acari per mosca; e su una sola mosca furono contate fino a 21 femmine del macrochelide). Due giorni dopo il lancio delle pupe si iniziarono le catture. Ad esempio la mattina del 22/11 furono catturate 143 mosche, per la maggior parte ocra, portanti complessivamente 158 femmine del macrochelide. Le mosche stavano posate, pressochè immobili, sulle pareti e con l'aiuto di un filo d'erba erano fatte cadere direttamente in una gabbietta di tulle. Trasportate immediatamente in laboratorio, le mosche erano eterizzate. Sotto l'azione dell'anestetico, la maggior parte dei macrochelidi allentano la morsa delle chele e si distaccano, ma non tutti. Le mosche, portanti ancora acari, furono tuffate in fissativo di Duboscq-Brasil ed il giorno successivo furono esaminate al binoculare di dissezione.

Nessuno dei 23 acari che erano rimasti attaccati, dopo eterizzazione, erano agganciati a setole. Le chele serravano una plica di ipoderma con le punte e i denticoli leggermente infossati nello strato cuticolare. Negli esemplari appena sfarfallati la plica stretta nella morsa era chiara come la porzione circostante; negli esemplari meno giovani assumeva invece un colore bruniccio.

Non è esatto, dunque, che i macrochelidi si aggancino esclusivamente alle setole dell'ospite, come alcuni autori sostengono, anche se questo è il caso più frequente. D'altro canto la costatazione fatta non giustifica la tesi del parassitismo. I chèliceri sono completamente estroflessi e giustapposti, mentre il

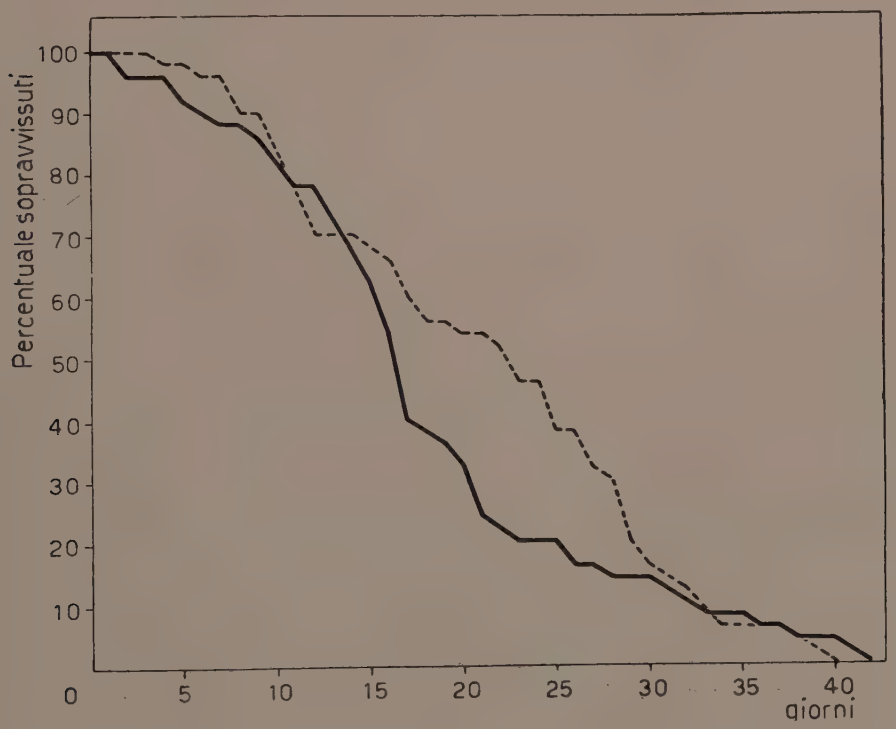


Fig. 1 — Curve di sopravvivenza in due gruppi di 50 maschi di *M. domestica*, con acari sinforisti (linea tratteggiata) e senza acari (linea continua).

corpo dell'acaro appare rigido e proteso. La posizione che assume l'acaro richiama in certo senso quella di un ginnasta che fa la « bandiera » sulla pertica. Del resto i macrochelidi assumono facilmente una posizione a « bandiera ». Negli allevamenti, successivamente intrapresi con diverse specie di macrochelidi, avevo cominciato a servirmi di un pennellino per il trasferimento degli acari, ma dovetti presto rinunciarvi. Le femmine, infatti, all'avvicinarsi del pennello, afferrano saldamente un pelo mediante le chele, restando il corpo

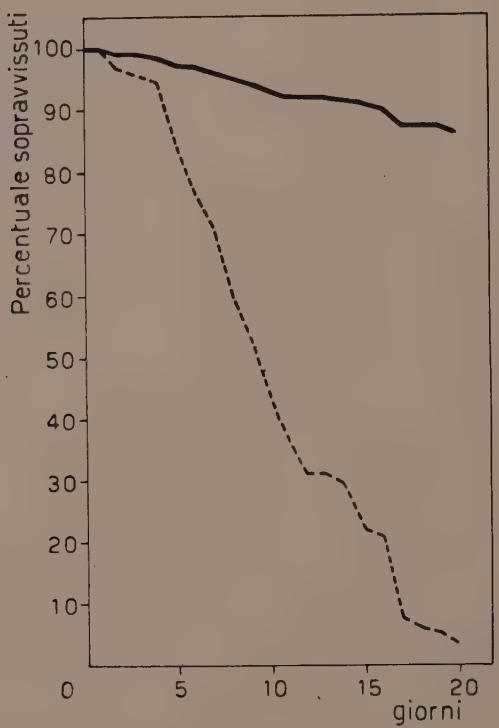


Fig. 2 — Curve di sopravvivenza in due gruppi di 250 femmine di *M. muscaedomesticae*, sinforiste su mosche (linea tratteggiata) e a digiuno (linea continua).

rigido e perpendicolare all'asse del pelo. Per staccarlo bisogna spezzare il pelo o attendere pazientemente che l'acaro spontaneamente lo abbandoni, avendo cura di tenere fermo il pennello e poggiarlo su una superficie. In tale posizione per utilizzare l'emolinfa dell'ospite, occorrerebbe non solo che le chele perforassero l'esoscheletro, il che non risulta dai molti esemplari esaminati, ma che le chele stesse fossero un organo di suzione, il che è assolutamente da escludere. E' ovvio infine che questa seconda modalità di agganciamento è possibile solo nel caso che il macrochelide sorprenda la mosca, immediatamente dopo lo sfarfallamento, prima dell'indurimento dell'esoscheletro.

Dalle osservazioni ed esperienze riferite è lecito dedurre che le femmine di *M. muscaedomesticae* che viaggiano su mosche non recano alcun danno al-

Tabella 12

Durata dell'associazione tra 50 femmine di M. muscaedomesticae e 10 maschi di M. domestica in 5 gruppi distinti: a, numero di acari complessivamente attaccati ai 10 maschi nei vari giorni dell'esperienza; b, frequenze cumulate degli stessi.

N° giorni	1		2		3		4		5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	45	45	50	50	49	49	50	50	49	49
2	43	88	48	98	47	96	47	97	46	95
3	44	132	48	146	48	144	50	147	50	145
4	45	177	44	190	43	187	46	193	43	188
5	33	210	36	226	33	220	38	231	31	219
6	33	243	35	261	35	255	33	264	35	254
7	30	273	28	289	25	280	30	294	22	276
8	22	295	21	310	18	298	24	318	18	294
9	15	310	18	328	17	315	20	338	12	306
10	11	321	6	334	10	325	12	350	9	315
11	9	330	6	340	—	325	12	362	8	323
12	7	337	6	346	—	325	8	370	5	328
13	2	339	6	352	—	325	3	373	—	328
14	1	340	—	352	—	325	2	375	—	328
15	1	341	—	352	—	325	1	376	—	328
16	—	341	—	352	—	325	—	376	—	328
17	—	341	—	352	—	325	—	376	—	328
18	—	341	—	352	—	325	—	376	—	328
19	—	341	—	352	—	325	—	376	—	328
20	—	341	—	352	—	325	—	376	—	328

l'ospite, nè ricavano da questo individualmente, alcun beneficio. E' evidente d'altro canto, come risulta dalla tabella 12, che il macrochelide non si aggancia soltanto provvisoriamente alla mosca. Si tratta in realtà, di una autentica associazione duratura, che, nelle condizioni dell'esperimento si è protratta in media, 7 giorni per ogni individuo, con un massimo di 15 giorni. E' noto come per un tale tipo di associazione Deegener (1918) abbia proposto il termine *sinforismo* (Synphorium), che, secondo Vitzthum (1943), indica un fenomeno nettamente distinto da quello della *foresi*, dove non si realizza in effetti una vera associazione, trattandosi di un agganciamento fugace. Accettando la distinzione di Vitzthum, possiamo in definitiva affermare che i rapporti tra femmine di *M. muscaedomesticae* e adulti di *M. domestica* sono riferibili ad un caso tipico di *sinforismo*, dovendosi assolutamente escludere una associazione di tipo parassitario.

Conclusioni

Le due specie, *M. muscaedomesticae* e *M. domestica* possono trovarsi insieme in natura in due circostanze diverse; (1) adulti di mosca possono trasportare femmine del macrochelide; (2) adulti e stadi di sviluppo del macrochelide coabitano in uno stesso biotopo (sterco di cavallo e di altri animali domestici) con stadi preimmaginali di mosche.

La frequenza con cui in natura si rinvengono mosche portanti macrochelidi esclude che il fenomeno possa considerarsi puramente occasionale. Le due specie, cioè, già per questo motivo, debbono ritenersi *associate*. Le esperienze ed osservazioni eseguite permettono di stabilire che questo primo tipo di associazione non è affatto di natura parassitaria, nè sarebbe esatto considerarlo un semplice caso di *foresi*: le femmine di *M. muscaedomesticae* sono infatti dei tipici *sinforisti* di *M. domestica*, nel senso di Deegener.

Le prove relative alla predazione dimostrano, d'altro canto, quanto segue. (1) *M. muscaedomesticae* è una specie creofaga e predatrice. (2) Essa è capace di aggredire qualunque stadio preimmaginale di *M. domestica*, anche se gli effetti distruttivi sul numero delle vittime vada decrescendo dalle uova alle larve di 3° stadio. Ciò è dovuto, oltre che all'aumento di mole della preda, alle variazioni della capacità di difesa di questa che è nulla allo stadio di uova, scarsa al primo stadio larvale, ma aumenta successivamente con l'indurirsi dell'esoscheletro e con l'aumentare della velocità di movimento. (3) L"attività predatrice del macrochelide si constata ancora, se uova e larve di mosche vengono immerse in un terreno colturale, il che implica nel predatore una attiva ricerca della preda e la capacità di individuarla.

Se ora si immagini un mucchio di sterco in cui individui di *M. muscaedomesticae* e stadi preimmaginali di *M. domestica* convivano, non è arbitrario supporre che si verifichi in natura ciò che si è osservato nelle prove sperimentali. Vale a dire, macrochelide e mosca realizzano in natura un secondo tipo di associazione, quella tra predatore e preda, che nella terminologia di Deegener prende il nome di *sillestismo* (Syllestium).

In definitiva *M. muscaedomesticae* è una specie predatrice di uova e larve di *M. domestica*, mentre le femmine del macrochelide sono *sinforiste* degli adulti del dittero. L'esistenza di un biotopo comune, in cui l'acaro svolge il suo intero ciclo biologico e che il dittero sceglie per le sue ovodeposizioni, rende facilmente ragione del legame esistente tra i due tipi di associazione.

Come è noto, sia il *sinforismo* che il *sillestismo*, ammettono gradi diversi di specializzazione. Nel nostro caso, è certo che femmine di *M. muscaedomesticae* si rinvengano anche su altri insetti fimicoli, il cui elenco fu compilato da Pereira e De Castro (1945), ma non si ha idea delle frequenze differenziali tra le varie specie. E' anche indubbio che il macrochelide possa predare altre specie.

Foà (1900), ad esempio, tentò colture di *M. muscaedomesticae*, servendosi di patate marce in cui gli acari si nutrivano « o di piccoli nematodi che vi si sviluppano, oppure di altri acari ». Ma proprio i risultati modesti conseguiti dalla Foà, nei confronti di quelli ottenibili con colture eseguite su sterco di cavallo con uova e larve di mosca, inducono a ritenere che il macrochelide non sia affatto indifferente circa l'oggetto della sua azione predatrice. La definizione del grado di specializzazione dell'associazione è senza dubbio di grande interesse, ma esulava dai limiti di questa prima indagine in cui ci si era solo proposto di chiarire la natura dell'associazione stessa.

RIASSUNTO

L'acaro *M. muscaedomesticae* ed il dittero *M. domestica* si trovano associati, in natura, in due circostanze diverse: (1) adulti e stadi larvali del macrochelide coabitano in uno stesso biotopo (sterco di cavallo, in prevalenza) con stadi preimmaginali di mosca; (2) adulti di mosca possono trasportare femmine del macrochelide.

Per quanto riguarda i rapporti tra acaro e stadi preimmaginali di mosca, le esperienze effettuate dimostrano: (1) *M. muscaedomesticae* è una specie creofaga e predatrice. (2) Essa è capace di predare attivamente qualunque stadio preimmaginale di mosca, ad eccezione delle pupe. (3) Il numero di individui della specie preda distrutti da un egual numero di predatori, nello stesso intervallo di tempo, è massimo allo stadio di uova, è ancora grande al 1° stadio larvale, diminuisce infine rapidamente negli stadi successivi. (4) La capacità di difesa della preda è nulla allo stadio di uova, trascurabile al 1° stadio larvale, ma aumenta in seguito per la maggiore rapidità di movimento ed il progressivo indurimento dell'esoscheletro. (5) L'attività predatrice del macrochelide si manifesta ancora, se uova e larve di mosche vengono nascoste in un terreno colturale, dimostrano nel predatore una attiva ricerca della preda e la capacità di individuarla. (6) Il macrochelide possiede un apparato boccale trituratore e non succhiante. Il ruolo principale, nella dilacerazione dei tessuti della vittima, è svolto dalla attività dei cheliceri. Si conclude che le due specie realizzano, in natura, un primo tipo di associazione, quello tra predatore e preda (*Syllestium* di DEEGENER).

Per quanto riguarda i rapporti fra femmine del macrochelide e adulti di mosca, le esperienze dimostrano: (1) La mosca non riporta alcun danno dall'associazione. La sopravvivenza in mosche portanti acari è identica a quella di mosche senza acari. (2) L'acaro non sottrae sostanze alla mosca. La sopravvivenza in acari trasportati da mosche risulta più bassa che in acari a digiuno. (3) Le chele dell'acaro stringono di solito una setola dell'ospite, ma possono serrare anche una plica dell'ipoderma, se la mosca è assalita, quando l'esoscheletro è ancora tenero. (4) La durata media dell'associazione, nelle condizioni dell'esperimento, è stata di 7 giorni, con un massimo di 15 giorni. Si conclude che le due specie realizzano un secondo tipo di associazione (*Symphorium* di DEEGENER), che non è di natura parassitaria, ma che non sarebbe esatto identificare ad un semplice caso di foresi. L'esistenza di uno stesso biotopo, in cui l'acaro svolge il suo intero ciclo vitale e che la mosca sceglie sovente per le sue ovodeposizioni rende possibili i due tipi di associazione, stabilendo un legame tra esse.

SUMMARY

The mite *Macrocheles muscaedomesticae* and the fly *Musca domestica* are found in association in nature in two different sets of circumstances: 1) adults and larval states of the Macrochelid live together in the same biotopes (horse dung, for the most part) with pre-imaginal stages of the fly. 2) Adult flies may carry female Macrochelids.

Experiments carried out in connexion with the relations between the mite and the pre-imaginal stages of the fly have shown that: 1) The species *M. muscaedomesticae* is carnivorous and predatory. 2) It is able to prey actively on every pre-imaginal stage of the fly except the pupal. 3) The number of individuals of the victim destroyed per unit time by a given number of predators is highest in the egg stage, still high in the first larval stage, but decreases rapidly in later stages. 4) The defensive powers of the victim are nil in the egg stage, negligible in the first larval stage, but increase in the later stages as the insect becomes able to move more rapidly and grows a harder exoskeleton. 5) The predatory activity of the Macrochelid is still manifested if the eggs and larvae of the fly are concealed in a soil medium, indicating that the predator actively looks for the victim and is able to identify it. 6) The mouth parts of the Macrochelid are crushing and not sucking. The tissues of the victim are attacked chiefly with the chelicerae. The conclusions drawn are that this first type of relation between the two species in nature is that between predator and prey (DEEGENER's *syllestium*).

Experiments in connexion with the relations between female Macrochelids and adult flies show that: 1) No damage to the fly ensues from the association. The survival rate of mite-carrying flies is exactly the same as that of that of miteless flies. 2) No matter passes from fly to mite. The survival rate of fly-carried mites is lower than that of fasting mites. 3) The chelicerae of the mite usually grip a bristle of the fly; if the fly is attacked while its exoskeleton is still soft, it may grip a fold of the epidermis. 4) The average period of association under the conditions of the experiment was 7 days with a maximum of 15 days. The conclusion is drawn that a second type of association is involved (DEEGENER's *symphorium*), which is not of a parasitic nature but which it would not be correct to describe as a simple case of phoresis. The fact that the mite develops its entire life cycle in the same biotope which is frequently chosen by the fly for egg laying makes the two types of association possible, and provides a link between them.

BIBLIOGRAFIA

CANESTRINI, G. e R. (1882): « I Gamasi italiani ». *Atti Soc. Veneto - trentina Sc. Nat.*, *8*, 3 - 82.

CANESTRINI, R. (1881): « Il genere *Gamasus* e la fillossera ». *Bull. Soc. Veneto - trentina Sc. Nat.*, *2*, 21-28.

DEEGENER, P. (1918): « Versuch zu einer System der Assoziations - und Sozietätsformen im Tierreiche ». *Zool. Anz.*, *49*, 1-16.

EWING, H. E. (1913): « A new parasite of the house-fly (*Acarina, Gamasoidea*) ». *Ent. News*, *24*, 452-456.

FOÀ, A. (1900): « Esistono il polimorfismo e la partenogenesi nei Gamasidi? ». *Bull. Soc. Ent. Ital.*, *32*, 121-149.

PEREIRA, C. e DE CASTRO, M. P. (1945): « Contribuçâo para o conhecimento da espécie tipo de *Macrocheles* Latr. (*Acarina*): *M. muscaedomesticae* (Scopoli 1772) emend ». *Arq. Inst. Biol., São Paulo, 16*, 153 - 186.

VITZTHUM, H. GRAF (1943): « *Acarina* ». Bronns' Klassen und Ordnungen des Tierreiches, 5 Band, 4 Abt., 5 Buch, 1-1011 + XI, Leipzig 1943.

ZANINI, E. (1928 - 29): « E' l'*Holostaspis badius* (Koch) parassita della mosca domestica? Contributo alla lotta contro la mosca domestica » *Boll. Lab. Zool. Agr. Bachìc. Milano*, *1*, 59-73.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 2 - Aprile 1955

DESTINO DELL'ACIDO BROMOACETICO MARCATO CON C^{14} INOCULATO IN *PERIPLANETA AMERICANA* (*)

S. BETTINI (**), M. BOCCACCI (**) e C. ROSSI (**)

E' generalmente accettato che le sostanze alchilanti alogenate, quali gli acidi iodo—, bromo— e cloroacetico, esplichino la loro azione tossica sopratutto bloccando i gruppi tiolici di alcuni enzimi (1, 2, 3).

Due degli autori hanno in precedenti ricerche (4, 5, 6) dimostrato che gli acidi iodo- e cloroacetico, anche negli insetti inibiscono l'attività triosofosfatodeidrogenasica mentre non influiscono sull'attività succinodeidrogenasica.

Nell'ambito di queste indagini sul meccanismo dell'azione tossica delle sostanze alchilanti alogenate, abbiamo ritenuto opportuno studiare il destino dell'acido bromoacetico col metodo dei radio indicatori. A tale scopo è stato inoculato in *Periplaneta americana* acido bromoacetico marcato C^{14} ed è stata poi controllata la radioattività nel sangue (a vari tempi) ed in vari organi e tessuti. Sull'estratto dell'insetto in toto sono stati eseguiti inoltre alcuni frazionamenti elettroforetici per individuare i prodotti (non proteici) che si formano per reazione con l'acido bromoacetico.

Tale tipo di indagine, che verrà approfondita in successivi lavori, tende ad individuare una eventuale elettività di alcuni organi e tessuti verso le sostanze alchilanti alogenate, ed a mettere in evidenza i prodotti derivanti da reazioni del tipo: $RSH + BrCH_2COOH = RSCH_2COOH + HBr$.

Parte sperimentale

Materiale biologico. — Ci siamo serviti di individui maschi di *P. americana* provenienti da un allevamento di laboratorio.

Prodotti impiegati. — L'acido bromoacetico-2-C^{14}, fornito dal Radiochemical Centre di Amersham (A.E.R.E.), aveva una attività specifica di

---

(*) *Il presente lavoro rientra nel piano di ricerche sulla resistenza da parte degli insetti verso sostanze insetticide concordato fra la Fondazione Rockefeller e l'Istituto Superiore di Sanità.*

(**) *Istituto Superiore di Sanità - Roma.*

0,01 mc/mg. La soluzione del sale sodico è stata preparata sciogliendo il prodotto nella quantità stechiometrica di NaOH N/10. Di tale soluzione, per un controllo della purezza del prodotto, si sono eseguite delle cromatografie ed elettroforesi su carta secondo le tecniche appresso descritte. Nella fig. 1 sono riportate le autoradiografie relative alle cromatografie ed elettroforesi su carta di tale soluzione. Il prodotto è di buona purezza e contiene solamente piccole quantità di un secondo componente.

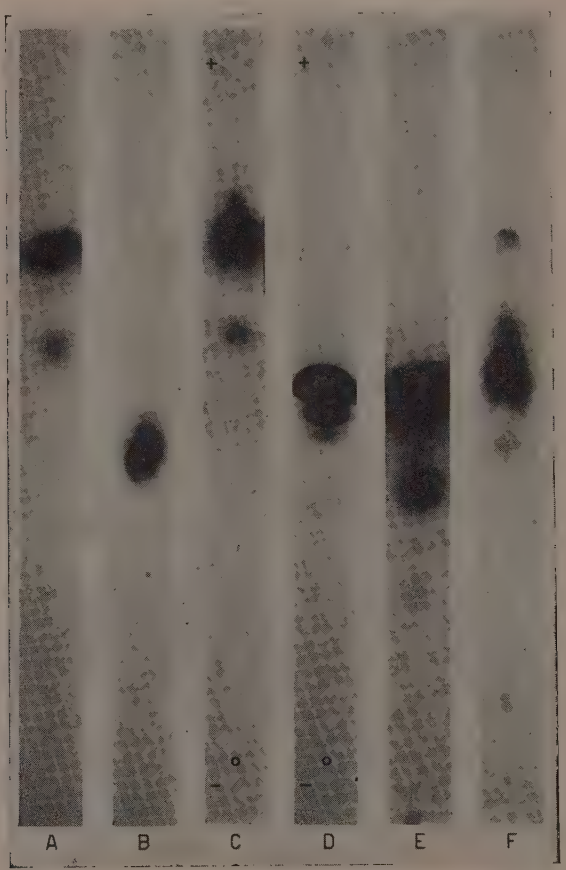


Fig. 1. — Autoradiografie delle cromatografie ed elettroforesi su carta della soluzione di acido bromoacetico-2-C^{14}. A) Cromatografia della soluzione appena preparata (solvente 1, durata 24 ore). B) Cromatografia della soluzione appena preparata (solvente 2, durata 18 ore). C) Elettroforesi della soluzione appena preparata (durata 6 ore). D) Elettroforesi della soluzione conservata per 60 giorni a -25°C (durata 4 ore). E) Cromatografia della soluzione conservata per 60 giorni a -25°C (solvente 1, durata 16 ore). F) Cromatografia della soluzione conservata per 60 giorni a -25°C (solvente 2, durata 24 ore).

Nella fig. 1 sono anche riportate le autoradiografie delle cromatografie ed elettroforesi su carta della stessa soluzione dopo 60 giorni di conservazione a — 25°C. Si nota un leggero aumento della macchia del secondo componente già presente all'inizio, e la comparsa di piccolissime quantità di altri componenti.

Metodi

Inoculazione in P. americana. — Abbiamo seguito il metodo già descritto in un precedente lavoro (6) impiegando una siringa micrometrica.

Prelievi di sangue, di organi e di tessuti. — Le blatte venivano fissate con spilli entomologici su piastre di paraffina con le antenne volte verso la periferia in modo che sporgessero dal bordo della piastra. Le antenne venivano fissate con listerelle di cellophane adesivo. Dopo l'inoculazione, una delle antenne veniva recisa a circa 2 cm. dalla base e la goccia di sangue fuoriuscente veniva posta per contatto diretto su piccoli rettangoli di sottile foglio di alluminio già tarati, delle dimensioni 0,6 cm $\times$ 1,0 cm. Fra un prelievo e l'altro onde evitare perdita di sangue, l'estremità mozza della antenna veniva termocauterizzata.

Dopo un periodo di 4 ore, effettuati tutti i prelievi di sangue, le blatte venivano fissate sul dorso e le zampe recise all'altezza del trocantino; poi l'insetto veniva aperto seguendo una linea longitudinale dall'apice dell'addome al collo, di poco discosta dalla linea mediana, in modo da risparmiare la catena dei gangli nervosi centrali. Gli organi e tessuti, dopo il prelievo, venivano anch'essi posti sui rettangoli tarati di foglio di alluminio.

La dissezione ed il prelievo di tessuti è stato sempre effettuato in camera termo-idro-regolata, a temp. di 20° ed umidità del 75%, per impedire la disidratazione dei tessuti e rendere così più agevole l'operazione.

Il materiale biologico prelevato veniva tenuto in essiccatore, nel vuoto, su acido solforico, per 24 ore e quindi pesato.

Misura della radioattività dei campioni. — I campioni prelevati per la misura erano costituiti da parti di organi o di tessuti del peso secco di circa un milligrammo ed aventi approssimativamente la forma di un disco di 2-3 mm. di diametro; la misura della radioattività era eseguita ponendo il campione a circa 2 mm. dalla finestra di un contatore di Geiger. Con tali campioni l'autoassorbimento per le radiazioni del C^{14} era notevole (dell'ordine del 50%) e non uguale per tutti, ma come si può vedere dalla tabella I tali irregolarità non arrivavano a nascondere gli effetti che si volevano porre in evidenza in questa prima indagine semiquantitativa.

Per i campioni di sangue (circa 0,5 μl) invece, l'autoassorbimento era naturalmente regolare e trascurabile.

Esecuzione delle autoradiografie. — Queste sono state ottenute come al solito ponendo una pellicola radiografica a contatto delle strisce di carta con

tenenti le sostanze radioattive separate per cromatografia o per elettroforesi. L'esposizione è stata di 2 giorni per i campioni di acido bromoacetico, (circa 2 μl della soluzione) e di 15-20 giorni per le cromatografie o elettroforesi del sangue o degli estratti (circa 6 μl di ognuno).

Lo sviluppo fotografico è stato poi fatto con un rivelatore a forte contrasto.

Cromatografia su carta. — Ci siamo serviti della cromatografia su carta sia per controllare la purezza dell'acido bromoacetico-2-C^{14}, sia per seguire nel tempo l'andamento della radioattività nel sangue di blatta inoculata con il suddetto prodotto.

Abbiamo seguito la tecnica ascendente usando il solvente isobutanolo-acido acetico-acqua 4:1:1 (solvente 1) e la tecnica discendente con il solvente fenolo saturo di acqua, in ambiente di ammoniaca (solvente 2). Con ambedue i solventi si è usata carta Whatman N. 1.

Il sangue di blatta fuoriuscente dall'antenna veniva posto direttamente sulle strisce di carta.

Dopo 24 ore di scorrimento del solvente, le strisce venivano prelevate e lasciate a temperatura ambiente per qualche ora, quindi passate su vapori di ammoniaca (per fissare gli eventuali prodotti acidi volatili) e poi tenute per 10' in stufa a 100°. Dalle strisce si ottenevano le autoradiografie secondo la tecnica sopra descritta.

Preparazione ed elettroforesi su carta degli estratti. — Gli estratti di blatta sono stati ottenuti nel modo seguente. Individui maschi sono stati inoculati con μg 180 di acido bromoacetico-2-C^{14} e trascorse 4 ore dalla inoculazione, dopo averli privati dell'apparato digerente se ne è preparato l'estratto secondo il metodo di Awapara (7). L'estratto è stato poi concentrato ad 1/10 del volume originale, in modo che 0,2 cm^3 corrispondessero a 1 g di tessuto.

Le elettroforesi sono state eseguite su carta Whatman N. 1 con tampone fosfati di pH 7,0 e $\mu = 0{,}05$; l'attrezzatura usata permetteva l'impiego contemporaneo di sei strisce di carta dalle dimensioni di 3 cm $\times$ 30 cm con una tensione massima di 500 volt.

Dopo aver deposto una certa quantità dell'estratto o della soluzione di acido bromoacetico-2-C^{14} sul punto di partenza delle strisce già equilibrate, si applicava una tensione di 10 volt/cm e dopo periodi varianti da 2 a 6 ore, le strisce venivano tolte dalla vaschetta ed essiccate in stufa a 100°.

Dalle strisce si ottenevano le autoradiografie secondo la tecnica già descritta.

Risultati e discussioni

Radioattività nel sangue. — L'andamento nel tempo della radioattività nel sangue di blatta, dopo inoculazione di acido bromoacetico-2-C^{14}, è stato seguito sui campioni di sangue prelevati come in precedenza descritto.

Nella fig. 2 sono riportati in grafico i risultati ottenuti inoculando quantità diverse di acido bromoacetico-2-C^{14} e precisamente 90 μg (tracciato 1), 180 μg (tracciato 2), e 360 μg (tracciato 3) per individuo, corrispondenti a circa 1, 2 e 4 DL_{50} rispettivamente.

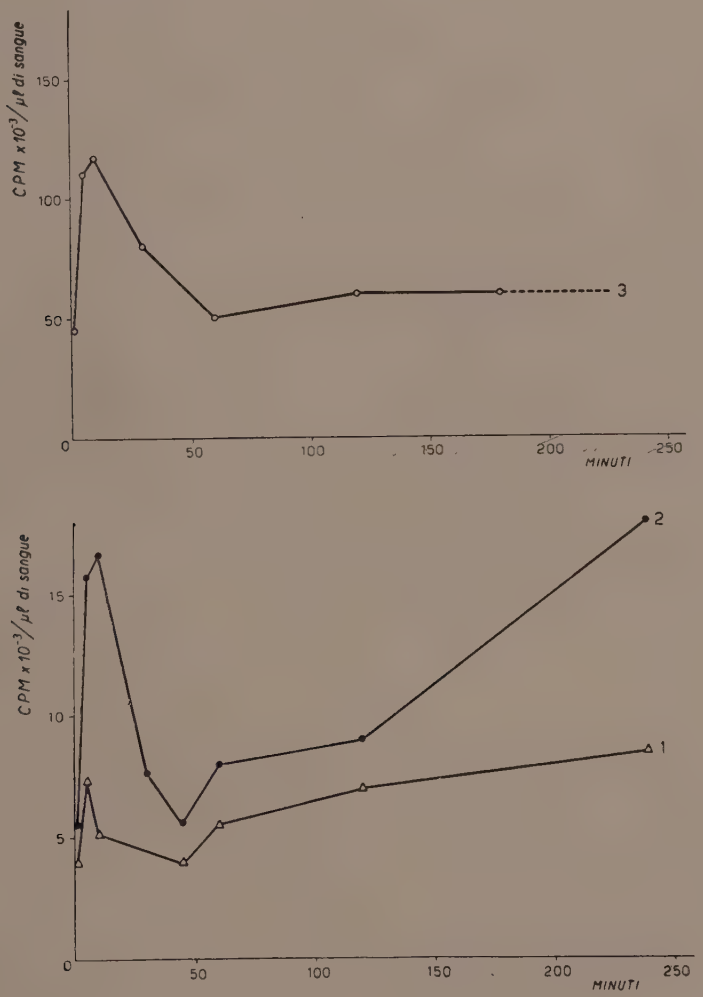


Fig. 2. — Andamento nel tempo della radioattività del sangue di individui di *P. americana* inoculati con μg 90 (tracciato 1), μg 180 (2) e μg 360 (3) di acido bromoacetico-2-C^{14}.

I valori riportati in ordinata sono espressi in cpm $\times 10^{-3}/\mu l$ di sangue e sono stati ricavati dai valori ottenuti dal residuo secco del sangue (il residuo secco del sangue di *P. americana* è del 13% circa).

L'esame del grafico indica che la radioattività è in rapporto alla dose

inoculata; essa raggiunge il massimo di intensità tra 5-10' dal momento della inoculazione e poi cade rapidamente sino a raggiungere un minimo dopo 50 60'.

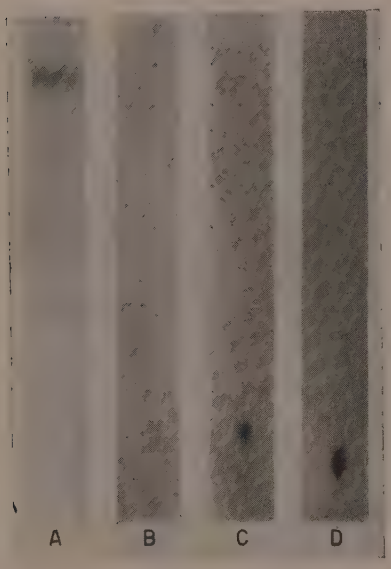


Fig. 3. — Autoradiografie di cromatografie su carta (solvente 1) del sangue, a vari tempi dall'inoculazione, di un individuo di *P. americana* inoculato con µg 180 di acido bromoacetico-2-C^{14}. A) 10 minuti dopo l'inoculazione. B) 45 minuti dopo l'inoculazione. C) 2 ore dopo l'inoculazione. D) 4 ore dopo l'inoculazione.

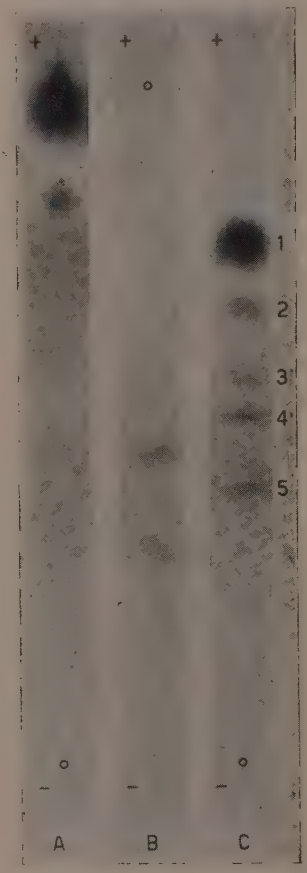


Fig. 4. — Autoradiografie delle elettroforesi su carta dell'estratto deproteinizzato di individui di *P. americana* inoculati con µg 180 di acido bromoacetico-2-C^{14}. A) Soluzione di acido bromoacetico-2-C^{14}. B) Estratto di *P. americana*: componenti elettropositivi. C) Estratto di *P. amer ca na*: componenti elettronegativi.

Nel corso delle successive 3 ore, si ha un nuovo aumento della radioattività che al termine della esperienza (4 ore dal momento della inoculazione) raggiunge valori anche più alti di quelli registrati a 5-10'.

Nel tracciato 3 il fenomeno è meno evidente perchè dopo 60' si ha un lieve aumento della radioattività che poi si stabilizza su un dato valore sino all'ultimo prelievo. Va però tenuto presente che in questo caso, in seguito alla alta dose di tossico ricevuta, l'individuo era moribondo a 2 ore dalla inoculazione e dopo 3 ore è morto.

Per spiegare l'andamento della radioattività nel sangue si può supporre che l'acido bromoacetico-2-C^{14}, che si diffonde con rapidità nel sangue, venga in un primo tempo altrettanto rapidamente fissato dai tessuti e che poi questi cedano lentamente al sangue i prodotti di reazione solubili.

Per avvalorare tale ipotesi abbiamo eseguito delle cromatografie su carta (solvente 1) del sangue di blatta prelevato a vari tempi dalla inoculazione.

Nella figura 3 si può notare che già 45' dopo l'inoculazione, la macchia dell'acido bromoacetico (Rf = 0,9) è completamente scomparsa, mentre si nota la comparsa di altre macchie di Rf molto più basso, che col tempo aumentano sempre più.

Che la radioattività dopo 4 ore dalla inoculazione superi addirittura i valori trovati a 5-10', potrebbe spiegarsi col fatto che in seguito ai numerosi prelievi effettuati, il volume del sangue al termine della esperienza è notevolmente diminuito.

Distribuzione della radioattività nei vari organi e tessuti. — Nella tabella I sono riportati i valori della radioattività espressa in cpm/mg di tessuto secco. Tali valori sono stati ottenuti da più prove. Dato il procedimento usato per la determinazione, si deve attribuire ai risultati riportati solo un valore semiquantitativo.

Per evitare che un forte errore nei risultati potesse derivare dalla presenza di sangue nei tessuti, data la sua alta attività specifica, le blatte sono state dissanguate prima della dissezione. Si è calcolato che il volume di sangue rimasto nella blatta dopo il dissanguamento può portare ad un errore massimo del 10% sui risultati della radioattività.

Nella tabella i materiali biologici sono elencati in ordine decrescente della loro radioattività specifica.

TABELLA I.

Distribuzione della radioattività in vari organi e tessuti di individui maschi di P. americana inoculati con acido bromoacetico-2-C^{14}. I valori della radioattività sono espressi in cpm/mg di materiale secco.

Organi e tessuti	Dosi inoculate/individuo		
	90 µg	180 µg	360 µg
Vaso dorsale	600	1200	3000
Corpi grassi	440	1400	3000
Catena ganglionare ventrale	400	1000	2000
Esoscheletro	220	800	1200
Ingluvie	190	500	1000
Muscoli del metatorace (m. indiretti del volo)	150	300	700
Muscoli del mesotorace (m. indiretti del volo)	150	300	600
Muscoli della coxa molto pigmentati	90	200	600
Muscoli della coxa poco pigmentati	70	200	540
Muscoli della coxa non pigmentati	60	150	350
Ghiandole accessorie	60	120	250
Colon	500	600	800
Tubi malpighiani	1500	1500	2000
Feci del retto			1070

Si fa notare tuttavia che per alcuni di essi (esoscheletro, corpi grassi, ghiandole accessorie) il rapporto peso fresco / peso secco è notevolmente più basso che non negli altri.

Nella maggior parte dei casi si nota un rapporto diretto tra entità della dose inoculata e i valori della radioattività riscontrata. Fanno eccezione il colon ed i tubi malpighiani, per i quali i valori della radioattività rimangono pressochè costanti con l'aumentare della dose.

Probabilmente tale comportamento è dovuto alle particolari funzioni di tali organi.

Per quanto riguarda i tubi malpighiani è verosimile che per la loro nota attività escretoria si abbia nei loro tessuti un considerevole passaggio di acido bromoacetico, tale da determinare già alle dosi più basse la « saturazione » (*) dei tessuti.

(*) S'intende « saturato » un tessuto quando tutti i gruppi tiolici in esso presenti abbiano reagito con l'acido bromoacetico.

Per il colon invece si deve tener conto di due funzioni proprie dell'organo: quella di assorbimento (dal lume intestinale) (8, 9, 10) e quella di escrezione (dall'emocele) (11, 12). L'importanza della prima funzione, per quanto riguarda il nostro esperimento, è trascurabile in quanto l'acido bromoacetico eventualmente proveniente dai tubi malpighiani, impiegando circa due ore per raggiungere il tratto di colon di cui si è misurata la radioattività, ha tempo di reagire sia con i tessuti dell'intestino che con i residui alimentari in esso presenti.

La seconda funzione invece, cioè quella escretoria, può portare similmente a quanto avviene nei tubi malpighiani, a saturazione dei tessuti del colon. Che esista una notevole funzione escretoria da parte di questo organo, lo dimostra anche la presenza di notevole radioattività nelle feci prelevate dalla ultima porzione del retto. Poichè il cibo impiega circa 17 ore a percorrere il proctodeo nella sua lunghezza e dato che il prelievo è stato effettuato dopo sole 5 ore dalla inoculazione, non è possibile che la radioattività riscontrata nelle feci derivi dai tubi malpighiani che sono situati all'inizio del proctodeo.

Per l'ingluvie i valori della radioattività sono risultati in diretto rapporto con la dose inoculata; l'attività escretoria di questo tratto dell'intestino è scarsa o nulla.

E' da notare inoltre che i valori della radioattività del tessuto muscolare (muscoli scheletrici) sono in genere bassi. Per i muscoli della coxa in particolare si ha una maggiore radioattività nei muscoli più pigmentati che presentano anche, come in precedenza dimostrato, (4) una maggiore attività succinodeidrogenasica. Si rimanda al citato lavoro per la nomenclatura dei muscoli prelevati.

Composti radioattivi presenti negli estratti. — Nella fig. 4 vengono riportate le autoradiografie di alcune separazioni elettroforetiche su carta effettuate sugli estratti preparati con il metodo già descritto.

Si può notare la presenza di cinque componenti che migrano verso il polo positivo e di due componenti che migrano in senso opposto. Nessuno dei componenti che migrano verso il polo positivo è identificabile con l'acido bromoacetico o con l'impurezza già presente nel prodotto di origine, perchè questi hanno una velocità di migrazione maggiore, come risulta chiaro dalla autoradiografia di confronto A della stessa fig. 4.

Uno dei componenti (N°. 1 striscia C) è presente in quantità notevolmente superiore a quella degli altri. Da prove di confronto eseguite a parità di condizioni, è risultato che tale componente ha la stessa velocità di migrazione dell'S-carbossimetil glutatione.

Gli altri componenti, la cui identificazione è attualmente in corso, sono probabilmente da ricercarsi tra i prodotti di reazione dell'acido bromoacetico con sostanze contenenti funzioni tioliche e normalmente presenti nei liquidi biologici, quali la cisteina, omocisteina, ergotioneina, coenzima A.

RIASSUNTO

Gli AA. hanno inoculato acido bromoacetico-2-C^{14}, a dosi crescenti, in *P. americana* ed hanno misurato la distribuzione della radioattività nei vari organi e tessuti. La radioattività del sangue ha dato valori iniziali molto elevati che si sono abbassati verso i 50 minuti per poi ritornare alti verso i 250 minuti. Le cromatografie su carta effettuate sul sangue contemporaneamente ai dosaggi della radioattività, hanno rivelato che già 45' dopo l'inoculazione, l'acido bromoacetico è completamente scomparso mentre si nota la comparsa di altri composti radioattivi che col tempo aumentano sempre più. I valori della radioattività dei tessuti ed organi in genere sono risultati direttamente proporzionali alle dosi inoculate, eccetto che per il colon ed i tubi Malpighiani ove i valori non hanno variato molto con l'aumentare delle dosi, indice questo di una probabile « saturazione » di tali organi già alla dose più bassa. I valori della radioattività del tessuto muscolare sono risultati piuttosto bassi; si è notato una più alta radioattività nei muscoli più pigmentati e a maggior contenuto di succinodeidrogenasi. Le autoradiografie di alcune separazioni elettroforetiche su carta degli estratti deproteinizzati di blatte trattate hanno mostrato 5 componenti elettronegativi, dei quali, uno, presente in notevole quantità, ha mostrato la stessa velocità di migrazione dell'S-carbossimetil glutatione, e due componenti elettropositivi.

SUMMARY

The authors inoculated 2-C^{14} bromoacetic acid into *P. americana* in increasing doses and measured the distribution of the radioactivity in the organs and tissues. Blood radioactivity gave very high initial values which dropped in the first 50 min. and then rose once more up to 250 min. Paper chromatograms of the blood were taken simultaneously with the radioactivity determinations and showed that the bromoacetic acid had already disappeared completely 45 min. after inoculation, while other radioactive compounds appeared which continued to increase as time went on. The radioactivity values of the tissues in general were in direct proportion to the doses inoculated except in the colon and Malpighian tubes, where there was little variation as the doses were increased, indicating probably that a « saturation » value had been reached in these organs at fairly low doses. The muscular tissue radioactivity values were rather low, with higher radioactivity in the more pigmented muscles whose succinic dehydrogenase content was also greater. Some paper electrophoretic separations of deproteinized extracts of treated cockroaches were autoradiographied; five electronegative components appeared, one of which (present in considerable quantity) showed the same migration rate as S-carboxymethyl glutathion, and two electropositive components.

BIBLIOGRAFIA

1) Barron E. S. G. (1951): *Advances in Enzymology, XI*, 201.
2) Mackworth J. F. (1948): *Biochem. J., 42*, 82.
3) Rapkine L. (1938): *Biochem. J., 32*, 1729.
4) Bettini S. e Boccacci M. (1954): *Rend. Ist. Sup.San., 17*, 188.
5) Bettini S. e Boccacci M. (1955): *Experientia, 11*, 70.
6) Bettini S. e Boccacci M. (1955): *Riv. Parass., 16*, 14.
7) Awapara J. (1948): *Arch. Biochem. Biophysics, 19*, 172.
8) Eidmann H. (1922): *Biol. Zentralbl., 42*, 429.
9) Day M. F. e Powning R. F. (1949): *Australian J. Sci. Res., B, 2*, 175.
10) Waterhouse D. F. (1951): *Australian J. Sci. Res. B, 4*, 144.
11) Metalnikov S. (1896): *Bull. Acad. Sci. U.R.S.S., 4*, 495.
12) Steudel A. (1913): *Zool. Jahrt. Abt. Allgem Zool. Physiol., 33*, 165.

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 1 - Aprile 1955

NUTRITIONAL REQUIREMENTS OF INSECTS

ZWI H. LEVINSON (*)

To Professor G. G. Mer, *O.B.E., M.D., Director, Malaria Research Station of the Hebrew University, Rosh-Pina, on his 60th Birthday.*

With the expanding use of insects as laboratory animals and with the development of resistance to insecticides, the interest in insect physiology and especially in nutritional physiology has increased. It was therefore decided to review and to condense up to date the more important literature and to present some of the recent work done in this laboratory concerning the nutritional requirements of insects.

A thorough knowledge of the nutritional factors for insects might provide research workers with useful information for the development of agents antagonistic to indispensable factors, which would be an entirely new approach to the problem of insect control. The author in doing insecticidal research has taken this approach, and is studying the nutritional requirements of the housefly, with special emphasis on its micronutrients.

As regards to their diverse feeding sites, insects may be grouped generally into main categories of (1) phytophagous, (2) zoophagous, (3) saprophagous and (4) pantophagous insects. The large group of phytophaga is represented by phycophagous, mycetophagous and lichenophagous insects, and numerous kinds of spermatophyte feeders. The zoophagous insects are divided among the parasitic entomophaga and the predatory harpactophaga. Saprophaga include coprophagous, necrophagous, geophagous and detrivorous insects (Dethier 1947).

Much progress has been attained in determining the nutritional requirements for growth of insects whose natural diet could be readily substituted by artificial rearing media. On the contrary, little knowledge is available concerning the nutritional requirements of phytophagous and entomophagous

(*) *Medical Research Laboratories, Medical Corps, Israel Defence Forces, Israel.*

insects, probably due to the experimental difficulty in rearing them on synthetic diets.

Before reviewing the nutrients required by the species studied up to date, it should be convenient to give some introductory definitions. Nutritional factors should be defined as chemicals of the lowest molecular weight which will adequately nourish an organism. According to the amounts required, nutritional factors are divided among macro- and micronutrients. For exact determination of its nutritional requirements, it is necessary to rear an insect through several generations on an absolutely sterile diet consisting exclusively of nutritional factors.

1. Water and Salts.

Water is indispensable to all insects. The quantities required depend upon the rate of water elimination from the insects' body; and this, in turn, depends upon the permeability of the cuticle, the amount of urine excreted, the tracheal closing mechanism and the relative humidity of the environment (Kuehnelt 1928, Mellanby 1934, Wigglesworth and Gillet 1936, Wigglesworth 1947). A few examples may illustrate this. Insects producing liquid excrements (e. g. *Musca, Apis*) have to drink water frequently not to die from dessication; on the other hand, e. g. *Tenebrio molitor,* extracting water exhaustively from its excrement, requires relatively small amouts of water in its food. At low relative humidity *Cimex* retains more water in its body after each blood meal than it does at higher humidities (Mellanby 1932).

Some insects adapted to very dry conditions are able to store water produced by metabolic processes (Fraenkel and Blewett 1944). Thus, complete oxidation of 100 gm fat as triolein would yield about 106 gm of « metabolic water ». This is certainly an important source of water in *Tenebrio molitor* (Buxton 1930) and in *Tineola biselliella* (Babcock 1912), which both live in very dry environments.

There is also evidence that some species obtain water by extracting various foods which they excrete entirely undigested, as in the case of desert habitants eating dead plants which have absorbed water during the humid nights (Buxton 1924) or as *Tenebrio* (Schulz 1930).

Electrolyte and fluid balance are maintained largely by means of salt intake. In addition, a number of ions essential in trace quantities play an important part in the structure and catalytic function of various enzymes; thus, for example copper is a constituent of tyrosinase and similar cuticular enzymes found in various arthropods; iron is a constituent of the cytochrome system of all insects and of hemoglobin of the few insect species in which hemoglobin occurs.

So far, some of the ions required by vertebrates were shown to be also

essential to several species of insects. The nutritional importance of salts in insects has probably been considered for the first time in larvae of *Bombyx mori,* which retain phosphorus, potassium and magnesium selectively from the mulberry leaves on which they feed (PÉLIGOT 1867). The aquatic larvae of *Aedes* (WIGGLESWORTH 1933), *Phlebotomus* (THEODOR 1936) and *Chironomus* (KOCH 1934) absorb water and chlorides through the thin-walled cuticle of their anal papillae. If *Culex* larvae have the sodium chloride content of their blood reduced to 0.05 per cent by keeping them in distilled water, and they are then transferred to tap water containing less then 0.006 per cent of NaCl, they extract the chloride from the water and raise the concentration in the blood to the normal 0.3 per cent. *Aedes aegypti* can grow in water with a smaller chloride content than *Culex pipiens;* and certain species of *Anopheles* restricted to slightly brackish waters are perhaps less efficient in absorbing chlorides (WIGGLESWORTH 1938).

Absence or deficiency of mineral micronutrients can limit growth and development of insects on otherwise complete diets. Thus, sodium chloride and calcium chloride are required for larval development of *Aedes concolor* in the same proportion in which these salts occur in sea water (WOODHILL 1936). *Theobaldia incidens* (FROST, HERMS and HOSKINS 1936) and various European species of *Anopheles* (BATES 1939) were found to grow better on addition of magnesium to their diet; their survival is lengthened by supplementing the food with sodium and calcium. *Aedes aegypti* requires for rapid growth and full emergence of adults, addition of 0.005 M calcium chloride to a sterile diet containing casein, yeast extract, magnesium sulphate, potassium chloride and sodium chloride (TRAGER 1936). Development of *Aonidiella aurantii* is seriously retarded by feeding on rough lemon seedlings having low calcium and high nitrogen content (STEYN 1951). On the other hand, larvae of *Drosophila* grow apparently in absence or with only trace amounts of sodium or calcium; moreover they have been reared on a diet containing K_2HPO_4 and $MgSO_4$ as the sole salts. Potassium and phosphate are essential for growing *Drosophila* and can not be substituted by other ions (LOEB 1915, RUBINSTEIN, LWOWA and BURLAKOWA 1935, 1936). Phosphorus appears as a limiting factor in the growth of *Lucilia* larvae fed on mammalian blood (HOBSON 1935). In the larvae of *Tribolium* containing approximately 0.19 per cent phosphorus of its wet weight at all stages of the life cycle, growth is definitely delayed if the flour fed to it contains less than 0.1 per cent phosphorus (NELSON and PALMER 1935). Zinc has been claimed to be of importance for normal egg formation in *Bombyx mori* (AKAO 1935) and both zinc and copper are indispensable for normal growth of *Alabama argillaceae* (CREIGHTON 1938). The ratflea *Nosopsyllus fasciatus* grows normally on an artificial diet consisting of yeast, serum and erythrocytes; the latter can be readily substituted by pure ferrous ammonium sulfate without altering the larval growth rate (SHARIF 1937).

Mineral deficiency also limits reproduction. Thus, rearing the aphid *Macrosiphum pisi* on garden peas deficient in N, P, K, Ca, and Mg leads to a significantly reduced fecundity of this insect. The N and P deficiencies produce the greatest reduction in progeny (BARKER and TAUBER 1951).

2. PROTEINS.

Proteins are classified on the basis of their physical properties as:

a) simple proteins, subdivided into albumins, globulins, globins, prolamines, histones, protamines and albuminoids;

b) conjugated proteins, subdivided into nucleoproteins, glycoproteins, phosphoproteins, chromoproteins and lipoproteins;

c) derived proteins, subdivided into denaturated and coagulated proteins and peptides.

No living tissue is known which does not contain proteins. Animals ingest proteins of animal or vegetable origin, digest them by hydrolysing them to amino acids, absorb them, and synthesize with them their own proteins. Only autotrophic organisms synthesize proteins from inorganic substances. Amino acids are required by animals for building up new body tissue during growth and for regeneration of old tissues in the adult. Some amino acids can be synthesized; other amino acids cannot be synthesized by the growing animal; and some amino acids can be synthesized, although at a rate not rapid enough to satisfy the requirements of the growing animal. Therefore, the animal must receive the amino acids which it cannot synthesize itself from its dietary proteins. With very few exceptions, animal species of all phyla, from the *Protozoa* up to the *Chordata*, require a number of amino acids as nutritional factors.

It has been shown by earlier workers that certain dietary proteins are incomplete for some insects as *Blatella germanica, Drosophila melanogaster* and *Tineola biselliella* (MELAMPY and MAYNARD 1937, CROWELL and MCCAY 1937, MCCAY 1938, LAFON 1939). In Table 1 the approximate amino acid composition of some plant and animal proteins having different nutritional values for insects is summarized.

Gelatine or zein are inadequate as a sole source of dietary protein for the insects mentioned above. *Tribolium confusum* is unable to grow when given zein or gliadin, whereas addition of both lysine and tryptophane to zein permits normal growth, as obtained with casein as the only dietary protein (FRAENKEL 1948). Larvae of *Lucilia sericata* (MICHELBACHER, HOSKINS and HERMS 1932), *Calliphora erytrocephala* (SEDEE 1953) and *Musca vicina* (LEVINSON and CALMI 1953) grow normally on diets containing casein supplemented with l-cystine and whereas casein alone fulfills the amino acid requirements for growing larvae of *Aedes aegypti* (TRAGER 1936), gelatine reduces growth markedly, and

TABLE 1.

Percentage Amino Acid Composition of Some Proteins Having Different Nutritional Values for Insects. (*Data from* GREENBERG 1951)

Protein	Casein	Edestin	Gelatin	Gliadin	Zein
Alanine	3 0	4.3	9.3	2.1	10.5
Arginine	4.1	17.4	8.6	2.6	1.7
Aspartic acid	7.2	13.4	6.8	3.3	4.6
Cysteine	0	0.5	0	0	0
Cystine	0.4	0.8	0.1	2.6	0.8
Glutamic acid	22.4	19.4	11.0	46.0	26 0
Glycine	2.7		25.5		
Histidine	3.0	2.6	0.7	2.1	1.3
Hydroxyproline	0		13.0		0
Hydroxylysine	0	0	1.3	0	0
Isoleucine	6.1	4.7	1.7	5.0	6.9
Leucine	9.2	7.4	3.5	6.5	15.4
Lysine	8.2	2.3	4.6	1.1	0
Methionine	3.0	2.4	1.1	1.7	1 5
Phenylalanine	5.5	5.5	2.3	5.7	7.0
Proline	11.6	4.6	14.2	13.4	10.0
Serine	5.9	6.3	3.2	4.9	7.0
Threonine	4.5	3.9	2.2	2.1	3.4
Tryptophane	1.7	1.6	0	0.6	0.1
Tyrosine	6.1	4.3	0.5	3.1	5.0
Valine	7.1	6.6	2.7	2.6	3.3

beef peptone and acid hydrolyzed casein plus tryptophane do not support it at all (TRAGER 1948, GOLBERG and DE MEILLON 1948). *Tenebrio molitor* grows at an optimal rate when casein, lactalbumin, groundnut protein or heat treated soybean protein are fed as the dietary proteins, although zein, gliadin or enzymic hydrolyzates of casein and lactalbumin are of little nutritional value (FRAENKEL, BLEWETT and COLES 1950).

The influence of proteins on growth and longevity has been studied extensively in cockroaches. The suitability of several proteins for growth of *Blattella germanica* has been determined and the relative nutritional values obtained are as follows: fibrin and casein, good; steamed egg albumin, lactalbumin,

wheat glutin, fair; enzymically hydrolyzed casein, zein, oxidized casein, gelatin, hemoglobin, poor (NOLAND and BAUMANN 1951). The most favorable protein level for development of *Blatella germanica*, *Blatta orientalis* and *Periplaneta americana* amounts to 22-24 per cent of the diet. *Periplaneta americana* has a somewhat greater protein requirement than the two other species. Nymphs of *Blatella germanica* are unable to reach maturity on diets containing 86-91 per cent of protein. Large white deposits, presumably urates or uric acid, appear in the fat body of those roaches. Changing the high protein diet to pure dextrin results in successive disappearance of the « white deposits » from the fat body and increased longevity of the roaches. The more protein *Blatta orientalis* and *Blatella germanica* consume, the shorter their life span; *Periplaneta americana*, however, lives comparatively shorter time, irrespective of its diet. Thus, the protein efficiency ratio decreases with increasing protein level and insect age (HAYDAK 1953).

More detailed studies have been made of the amino acids required by some insects species. By substituting sodium caseinate in the rearing diet with 11-14 amino acids and successively omitting a single one of this mixture, 11 essential amino acids for larvae of *Aedes aegypti* were determined: glycine, leucine, isoleucine, histidine, arginine, lysine, tryptophane, threonine, phenylalanine, methionine and cystine. The requirement for valine could not be evaluated because the yeast autolysate used as a source of water soluble vitamins contained relatively large amounts of this amino acid. Phenylalanine, which can be substituted by tyrosine, appears to play an important role in the pigmentation of larvae and pupae, although the pigmentation of the adults is apparently not influenced by the absence of phenylalanine or tyrosine from the larval diet. The effect of phenylalanine, tyrosine and some analogs upon pigmentation can be seen in Table 2.

TABLE 2.

The Effect of Phenylalanine, Tyrosine and Some of Their Derivatives on the Pigmentation of Larvae of Aedes aegypti. (*From* GOLBERG and DE MEILLON 1947).

Compound added to basal medium[1]	Concentration, gm/liter	Appearance of larvae
—	—	white, no yellow pigment visible
dl-phenylalanine	0.4	siphon and saddle clear yellow, no darkening
dl-phenylalanine	1.0	siphon definitely dark, saddle with dark area dorsally
l-tyrosine	0.4	do.
l-3-aminotyrosine	0.4	siphon and saddle clear yellow, no darkening
tyramine hydrochloride	0.4	do.
dl-α-aminophenylacetic acid	0.4	do.
l-3,4-dihydroxyphenylalanine	0.4	white, no yellow pigment visible
p-aminophenylacetic acid	0.4	siphon and saddle clear yellow to slightly dark

(1) consisting of 0,5 per cent gelatine, yeast autolysate and the essential amino acids except phenylalanine or tyrosine.

The omission of cystine from the larval diet results in considerable growth retardation, mortality and malformation of the imagines. Very often adult mosquitoes emerge only partially from the pupal cases and later die in this position. Substituting glutathione for cystine allows normal emergence of adults, although it does not enhance larval growth rate. It is obvious from this investigation that methionine can not compensate for the lack of cystine in the diet (GOLBERG and DE MEILLON 1948). The cystine requirement of *Aedes* is in good agreement with that of *Lucilia* (MICHELBACHER, HOSKINS and HERMS 1932), *Drosophila* (LAFON 1939), *Blatella* (HOUSE 1949), *Musca* (LEVINSON and CALMI 1953) and *Calliphora* (SEDEE 1953), thus indicating its general important function in insect development and metamorphosis.

For larval growth of *Drosophila* on a sterile diet consisting of sucrose, yeast nucleic acid, all the known B-complex vitamins, cholesterol, salts, glutathione and water, the addition of cystine, arginine, histidine, lysine, tryptophane, phenylalanine, methionine, threonine, leucine, isoleucine and valine is essential (SCHULTZ, LAWRENCE and NEWMEYER 1946, RUDKIN and SCHULTZ 1947, VILLEE and BISSELL 1948). However, adding glycine to those essential amino acids further improves growth and also exerts a detoxifying effect on essential amino acids fed in excessive amounts. Despite of its essentiality, arginine can be partly replaced by citrulline for growing larvae. Feeding excessive amounts of l-tryptophane, isoleucine and l-serine has an adverse effect on larval growth. d-Tryptophane cannot be utilized and d-serine is extremely toxic for larvae of *Drosophila* (HINTON, NOYES and ELLIS 1951).

HOUSE, also working under aseptic conditions with chemically defined diets, was able to demonstrate that valine, tryptophane, histidine and probably arginine are essential for growth, while cystine is indispensable for development of *Blattella germanica*. Neither growth nor development of this insect is affected when either glycine or methionine is omitted from the diet (HOUSE 1949). It is of course possible, that intracellular symbionts may provide the growing nymphs with some amino acids which are lacking in the experimental diets.

Larvae of *Tribolium confusum*, grown non-aseptically on a purified diet, require at least 10 essential amino acids: threonine, valine, leucine, isoleucine, arginine, lysine, methionine, phenylalanine, histidine and tryptophane (LEMONDE and BERNARD 1951, FRAENKEL and PRINTY 1954). If either lysine threonine, phenylalanine, methionine, isoleucine or arginine are singly lacking in the diet of *Tribolium*, the length of its pupal stage is doubled; instead of being 30 days as in ordinary experimental conditions, it lasts about 60 days. But if valine, histidine, tryptophane or leucine are singly omitted from the diet, practically no pupation occurs. On the other hand, alanine, aspartic acid, glutamic acid, cystine, tyrosine, glycine, hydroxyproline, proline and serine are not essential for growth and pupation (LEMONDE and BERNARD 1951).

Tribolium confusum is notably able to utilize the d-isomers of methionine,

phenylalanine and lysine. The d-forms of the other essential amino acids are, however, not utilizable (Fraenkel and Printy 1954).

The amino acids indispensable for growth of workers of *Apis mellifica* include arginine, histidine, lysine, phenylalanine, tryptophane, leucine, isoleucine, threonine, valine and methionine. Tyrosine, cystine, serine, glutamic acid, glycine, alanine, proline and hydroxyproline are apparently not essential, although glycine, serine and proline stimulate larval growth. Histidine is fully replaceable by carnosine, while arginine can be replaced only partly by citrulline. The growing honeybee is also able to utilize certain d-amino acids. Thus, d-phenylalanine, d-methionine and d-histidine can be readily replaced for the corresponding l-forms (De Groot 1952, 1953).

So far, proteins and amino acids have been discussed with respect to their role in growth, development and longevity. They are, however, also of considerable importance for normal reproduction, as can be seen from a few illustrative studies. Although *Musca domestica* lays a few eggs when fed saccharose, it lays many more eggs when fed boullion in addition to saccharose (Glaser 1923). Rearing larvae of *Musca vicina* on wheat bran enriched with casein, results in remarkably increased oviposition of the mature females which are fed saccharose only (Levinson 1951). Moreover, the length of the ovipositing period of this insect varies from 5-11 days in inverse proportion to the concentration, when fed solutions containing 0.125-20.0 per cent of peptone (Buei 1952). The number of eggs deposited by *Aedes aegypti* increases about 16 times when fed defibrinated sheep blood instead of washed erythrocytes of sheep. Feeding several proteins other than hemoglobin in addition to the washed erythrocytes, results in improved oviposition. However, the effect of whole sheep blood can be duplicated with isoleucine only, but not with other amino acids either alone or in combination (Greenberg 1951).

Thus, the amino acids required by the insects studied are among those which have been established as essential for the rat (Rose 1938), the mouse (Baur and Berg 1934, Maddy and Elvehjem 1949), the chick (Almquist 1947) and the protozoan *Tetrahymena* (Kidder and Dewey 1949).

The amino acids essential for growth of 5 species of insects are summarized in Table 3.

Polynucleotides (Nucleic acids).

These substances occur combined with proteins in the nucleoproteins, which are integral constituents of the cell nucleus. Polynucleotides, compounds of high molecular weight, consist of phosphoric acid, pentoses and heterocyclic bases (purines or pyrimidines). Desoxyribose nucleic acid is found, for the most part, in the nuclei of cells, whereas ribose nucleic acid is present mainly in the cell cytoplasm. Partial hydrolysis of those nucleic acids results in 2

differently constituted types of degradation products: a) the mononucleotides inosinic acid, guanylic acid, adenylic acid, uridylic and cytidylic acid, b) the nucleosides inosine, guanosine, adenosine and uridine, cytidine and thymidine.

TABLE 3.

Amino Acid Requirements of Several Species. (*Data from* GOLBERG *and* DE MEILLON 1948, RUDKIN *and* SCHULTZ 1947, HOUSE 1949, HINTON, NOYES *and* ELLIS 1951, LEMONDE *and* BERNARD 1951, DE GROOT 1952, FRAENKEL *and* PRINTY 1954).

	Arginine	Histidine	Lysine	Tryptophane	Phenylalanine	Cystine	Methionine	Threonine	Leucine	Isoleucine	Valine	Glycine
Aedes aegypti	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+
Apis mellifica (worker)	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	
Blattella germanica	+	+	−	+	−	+	−	−	−	+	−	−
Drosophila melanogaster	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tribolium confusum	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−

Polynucleotides are considered to stimulate growth of several species of insects. Growth of *Aedes aegypti,* for example, is significantly improved when ribose nucleic acid is added to a larval diet containing sterile heat killed yeast, riboflavin and a partly purified liver fraction. This can be seen from the growth index of the larvae, which equals 2 before and 14 after adding 0.1 mg of ribose nucleic acid per gm of diet (SUBBAROW and TRAGER 1940). Larvae of *Scobius granosus* have been found to respond similarly to addition of ribose nucleic acid to their synthetic diet (ROSEDALE 1949). However, a somewhat peculiar situation has been observed in the nucleic acid requirement of *Drosophila melanogaster*: larvae of a wild type strain (Oregon-R) can be raised aseptically to normal adults on a synthetic medium containing no nucleic acid; this indicates clearly that this strain can synthesize nucleic acid. Growth of these larvae, however, is improved and the time required for pupation is shortened upon the addition of nucleic acid. An inversion strain, on the contrary, was found incapable of completing development when the medium is devoid of nucleic acid, but grows well when nucleic acid is added.

A detailed study was undertaken to find out whether the whole nucleic acid molecule or only one or more of its constituents are required. No larval growth of the inversion strain takes place when nucleic acid is replaced by guanine, guanosine, guanylic acid, uracil, uridine, uridylic acid, cytidine or

cytidilic acid. Growth and development is normal only when adenine or its nucleoside or nucleotide is present in the medium. Likewise, when various combinations of the above mentioned purines and pyrimidines replace nucleic acid, growth does not occur unless adenine, adenosine or adenylic acid are added to the larval diet (HINTON, ELLIS and NOYES 1951). It is therefore possible to conclude that the inversion strain of *Drosophila melanogaster* has lost the ability to synthesize adenine, the part of the nucleic acid molecule essential for larval growth.

3. CARBOHYDRATES.

Carbohydrates are divided into 3 main groups:

a) monosaccharides, including bioses to decoses;

b) oligosaccharides, including di-, tri- and tetrasaccharides;

c) polysaccharides.

To most insects carbohydrates are necessary sources of energy for maintenance of adult life. However, there are species that do not require them for growth; for example, larvae of *Aedes aegypti,* which regain their metabolite reserve after starvation when fed on casein alone (WIGGLESWORTH 1942), or larvae of *Drosophila* (VILLEE and BISSELL 1948), *Calliphora* (SEDEE 1953) and *Musca* (LEVINSON and CALMI 1953) which grow aseptically on carbohydrate free synthetic diets. Those larvae store glycogen in addition to lipids during growth, although they are unable to utilize it until they have attained the pupal stage. On the other hand, the beetles *Tribolium, Ptinus, Silvanus, Lasioderma* and *Sitodrepa* and the moth *Ephestia* require certain amounts of dietary carbohydrate for normal growth and pupation (FRAENKEL and BLEWETT 1943). Larvae of *Tenebrio molitor* grow only when their diet contains at least 40 per cent carbohydrates, and grow at an optimal rate at a carbohydrate content of 72 per cent. Substituting the total carbohydrates at optimum level by starch, levulose or mannitol, results in rapid growth; glycogen, sucrose, glucose, lactose or xylose allows slow growth only, and while arabinose still permits survival of larvae, galactose or inulin cannot replace the nutritional value of the « total carbohydrates » present in the natural diet (LAFON and TEISSIER 1939). However, in a more recent study, *Tenebrio molitor* was found to grow most effectively on diets containing 80-85 per cent carbohydrates, consisting of starch or glucose, which are both equally well utilized (FRAENKEL, BLEWETT and COLES 1950). Larvae of *Tribolium confusum* grow at an optimal rate when their dietary carbohydrate is sucrose; their growth decreases slightly below optimal rate when sucrose is replaced by one of the following: starch, white dextrin, cellobiose, raffinose, maltose, mannose, glucose, mannitol and sorbitol. Inulin, melizitose, lactose or rhamnose support growth, but at a still slower rate,

whereas yellow dextrin, galactose, levulose, xylose or arabinose retard larval development and prevent pupation (BERNARD and LEMONDE 1949).

By comparing the survival rates of *Apis* larvae feeding on distilled water with those feeding on water solutions of various sugars, the availability of these carbohydrates as energy sources can be evaluated. By feeding solutions of sucrose, fructose, maltose, melizitose, glucose or honey, the survival rates obtained are 4 to 7 times greater than by feeding water. On solutions of trehalose or dextrin, the survival rates are 3 times greater, on lactose or galactose less than 2 times greater, and on glycogen or starch they are not greater than on water alone (BERTHOLF 1927, VOGEL 1931). On the other hand, adult honey bees cannot utilize some of the carbohydrates which support larval life (PHILLIPS 1927), as can be inferred from Table 4.

Like the adult honeybee, *Melanoplus* cannot utilize starch and other polysaccharides (BROWN 1937).

TABLE 4.

The Suitability of some Carbohydrates for Larvae and Adults of the Honey Bee. (*Data from* BERTHOLF 1927, PHILLIPS 1927, VOGEL 1931 *and* STAUDENMAYER 1938).

	Monosaccharides								Disaccharides				Trisaccharides		Polysaccharides			
	Pentoses				Hexoses													
	Rhamnose	Fucose	Xylose	Arabinose	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	Sucrose	Trehalose	Maltose	Lactose	Melizitose	Raffinose	Starch	Glycogen	Dextrin	Inulin
Larvae . . .	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−
Adults . . .	−	−	+	+	+	+	−	toxic (1)	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−

Addition of sucrose, glucose, galactose or mannose to water given to adults of *Calliphora* at 26°C prolongs their duration of life from 2-3 days to 1-2 months; whereas addition of lactose or xylose allows survival for only 1-2 weeks, addition of cellobiose is of no value (FRAENKEL 1936, 1940). Adults of *Drosophila* utilize glucose or mannose most efficiently, galactose less so, xylose or ribose only slightly, and arabinose or rhamnose not at all (HASSETT 1948). Similarly, xylose is also slightly utilized by larvae of *Aedes aegypti* (WIGGLESWORTH 1942). *Phormia regina* utilizes to some extent all pentoses except fucose; xylose and ribose are, however, more available to *Phormia* than arabinose,

(1) Mannose is also toxic to *Vespa vulgaris*. This toxicity seems to be due to antimetabolic activity depending on the similarity in structure between d-mannose and d-glucose (STAÜDENMAYER 1938).

rhamnose or desoxyribose. The hexoses, except sorbose, are well utilized. Among the disaccharides, maltose is most effectively used, while sucrose and trehalose are somewhat less utilizable; melibiose is utilizable only at an intermediate rate, whereas lactose and cellobiose are poorly utilized. The trisaccharides melizitose and raffinose are available energy sources. It is of interest to note, that there is no good correlation between the nutritional value of these carbohydrates and their acceptability in the blowfly (HASSETT, DETHIER and GANS 1950).

The polyalcohols mannitol and sorbitol are available as energy sources for adults of *Calliphora* and to a small extent for larvae of *Aedes aegypti* and adults of *Drosophila;* but dulcitol is not utilizable by *Calliphora* adults and *Aedes* larvae, erythritol and inositol are not utilizable by *Calliphora* adults and inositol is only slightly utilized by *Drosophila* adults (FRAENKEL 1940, WIGGLESWORTH 1942).

4. LIPIDS.

Lipids are broadly classified into:

a) simple lipids including fats, waxes and sterol esters;

b) compound lipids including phospholipids, cerebrosides and sulfolipids;

c) derived lipids including fatty acids, higher alcohols, hydrocarbons and the vitamins D, E and K.

Fats serve most insects as sources of energy and are used to build up reserves of fat and glycogen. Stored fat is utilized during periods of embryological development, metamorphosis and food scarcity. Dietary and stored fat provides insects living in a dry environment with metabolic water.

There is growing evidence that lipids are not among the essential nutritional requirements of insects, except for certain micronutrients which will be reviewed in the chapter dealing with accessory nutritional factors. The following insects have been reared successfully on artificial diets, which were either entirely lacking or deficient in saponifiable fat: *Camponotus* (SMITH 1944), *Drosophila* (BACOT and HARDEN 1922), *Galleria mellonella* (HAYDAK 1936), *Lucilia sericata* (HOBSON 1935), *Lyctus* (PARKIN 1936), *Musca vicina* (SILVERMAN and LEVINSON 1954), *Tenebrio molitor* (MARTIN and HARE 1942), *Theobaldia incidens* (FROST, HERMS and HOSKINS 1936) and *Zootermopsis angusticollis* (COOK and SCOTT 1933).

However, lipids have been shown to be of great importance in various metabolic processes and therefore their role in nutrition has been widely investigated. In addition, they support absorption of essential lipid soluble micronutrients (sterols).

Synthesis of saponifiable fat from carbohydrates or from proteins has been demonstrated for several species. *Bombyx mori,* when ready to pupate,

contains about twice as much fat than the leaves it has eaten (Uvarov 1928, Manunta 1935). *Eutettix tenellus* synthesizes fat when reared for some time on a solution containing 1.2 per cent of both glucose and fructose in distilled water (Fulton and Chamberlin 1934). The small amount of fat contained in milk stage corn as compared to the gradually increasing amount of fat with simultaneous rapid decrease of glycogen in *Heliothis armigera* towards pupation, indicates synthesis of fat from glycogen (Ditman 1938, Ditman and Weiland 1938). In xylophagous insects, larval fat originates from the pentoses present in wood (Timon-David 1927) and in *Pachymerus dactris,* stored fat is derived partly from carbohydrate or other non-lipid components of the *Manicaria* kernel (Collin 1933). The pantophagous *Periplaneta americana* can build its body fat from carbohydrates (Schweet 1941).

Dietary protein can also be converted into body fat by *Blattella germanica* (Melampy and Maynard 1937, McCay 1938) and by *Periplaneta americana,* although to a smaller extent than conversion of carbohydrate (Schweet 1941). The amount of fat in the larva of *Sarcophaga carnaria* plus the fat in the food residue exceeds the fat content of its medium, consisting of powdered horse meat or blood fibrin (Nishikata 1922). Casein or any suitable carbohydrate are transformed to body fat in starved larvae of *Aedes aegypti* to the same extent as fat itself (Wigglesworth 1942).

The composition of the body fat of insects is affected both quantitatively and qualitatively by the dietary fat. This can be seen in the larva of *Pachymerus,* which contains in its fat approximately 24 per cent of lauric acid, far more than in most other insect fats, although only about half that in the fat of the oil palm kernel upon which it feeds (Collin 1933). In *Blattella,* the body fat has an iodine value of 51 when fed on coconut oil (iodine value = 7), 59 when fed on butter fat (iodine value = 27) and 64 when fed on lard (iodine value = 49) (Melampy and Maynard 1937). The tissue fat of *Heliothis armigera* reared on dough-stage corn has a higher iodine value than that of caterpillars reared on milk-stage corn (Ditman 1938). When *Lucilia sericata* is reared on fish fat with an iodine value of 113, the larval fat has an iodine value of 120-140, and when a fat with an iodine value of 30 is given, the iodine value of the larval fat is 60. When the larvae are fed on fish fat (saponification number = 195), the saponification number of the larval fat is 190, rising to 215 before pupation; whereas when butter (saponification number = 210) is used as dietary fat, this value becomes 220 throughout the larval stage (Yuill and Craig 1937).

Fats nevertheless play a very important role in resistance to certain insecticides (Mer and Furmanska 1953) and in acclimatization to high temperature (Munson 1953), as demonstrated by the influence of environmental temperature on the chemical composition of insect fats (see Table 5).

For further information on insect lipids the interested reader may consult

the review of SCOGGIN and TAUBER (SCOGGIN and TAUBER 1950) which covers the general aspects of the subject up to 1949.

TABLE 5.

Influence of Environmental Temperature on Tissue fat of Several Species.

Species	Stage	Environmental Temperature, °C	Iodine Value of Tissue Fat	Investigator
Lucilia sericata . . .	larva	15 25 35	75.8 72 7 71.1	RAINEY (.938)
Calliphora erythrocephala	larva	18 27 36	91.0 75.6 65.5	FRAENKEL and HOPF (1940)
Phormia terra novae. .	larva	12 27 30–31	85.2 77.2 70.4	FRAENKEL and HOPF (1940)
Heliothis armigera . .	prepupa	25.5–31.1 29.4–37.2	70.7 65.8	DITMAN and WEILAND (1938)
Periplaneta americana .	nymph	17–27 27–32	72 60	MUNSON (1953)

5. ACCESSORY NUTRITIONAL FACTORS.

The term accessory nutritional factors is applied to a chemically heterogenous group of organic compounds: essential metabolites which one or more species of organisms are unable to synthesize in quantities sufficient for their normal requirements. These compounds must therefore be supplied to the animal by its diet or by microrganisms capable of synthesizing them. Absence of one or more accessory nutritional factors from the otherwise complete diet of various animals is followed by cessation of growth, more or less apparent pathological symptoms and finally by death. These conditions are curable to certain limits by adding the missing nutritional factors to the diet. Broadly speaking, accessory nutritional factors are identical to the substances called vitamins in the nutrition of vertebrates. Substances which may be accessory factors for one species of insects may not be for another species, because the latter might not require this substance or might be able to synthesize it by its own metabolic processes.

Certain accessory factors may carry on their essential metabolic function as components of more complex molecules (e. g. thiamine, which forms a part of the essential coenzyme thiamine pyrophosphate). In such instances, the

simplest substance capable of supplying the physiologic need is designed as the accessory factor. (Therefore, in the example mentioned, thiamine is the accessory factor and not thiamine pyrophospate, although the presence of adequate amounts of either in the diet would meet the requirements).

Accessory nutritional factors can be divided according to their solubilities into groups of (1) water soluble factors and (2) lipid soluble factors. In the following chapters, the requirements in factors of both groups will be discussed in detail.

I. Water Soluble Factors.

The water soluble factors, termed the vitamins of the B group, in work on nutrition of vertebrates, are necessary components of all living cells. Their function either alone or as structural components of more complex molecules, is in catalytic systems where they act as coenzymes. All B vitamins have similar functions in all cells of all species of plants and animals, including even single celled organisms. In certain species, however, they are produced adequately or even abundantly whitin the organism. For such species they are, of course, not accessory factors.

The compound named vitamin C or ascorbic acid is an accessory factor only for primates, guinea pigs and certain species of trypanosomes, but all plants and most animals, including the insects studied so far (Wollmann, Giroud and Ratsimamanga 1937, Martin and Hare 1942), can synthesize their own vitamin C.

The water soluble factors, their chemical composition and some of their properties are brought together in Table 6.

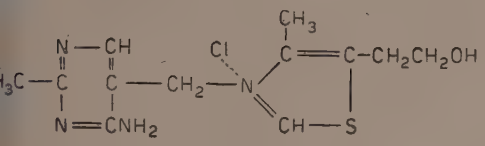
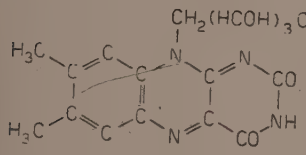
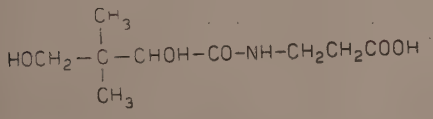
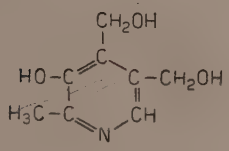
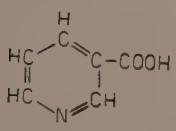
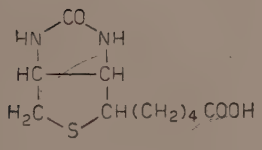
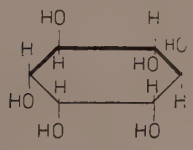
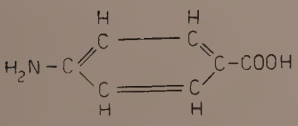
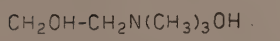
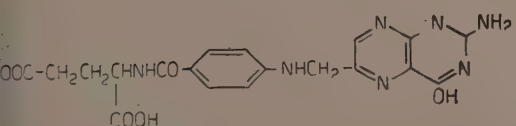
A. Thiamine.

Thiamine functions as a part of the catalytic system of living cells in the form of its pyrophosphate ester, cocarboxylase. This coenzyme is notably involved in the decarboxylation of pyruvic acid. That has been demonstrated in the larva of the rice moth, *Corcyra cephalonica*, which accumulates large amounts of pyruvic acid when fed a thiamine deficient diet (Sarma and Bhagvat 1942).

A histological examination of thiamine deficient larvae of *Corcyra cephalonica* revealed a very poor development of the muscular system and adipose tissue. Complete cessation of growth in the coelomic epithelium was observed in five day old larvae. At a larval age of thirty days the cytoplasm of the coelomic epithelium appears highly vacuolated and presents a glandular structure in certain regions. A lipid globule appears at random in the cytoplasm and tends to increase in size. The nucleus enlarges and the number of nucleoli increases. Due to pressure exerted by the lipid globules, the nucleus

TABLE 6. *Water Soluble Accessory Factors, the*

Accessory Factor	Synonym in Vertebrate Nutrition	Chemical Name
Thiamine hydrochloride . . .	Vitamin B_1, Aneurin	2-Methyl-5(4-methyl-5-β -hydroxyethyl-thiazolium chloride) - methyl-6-aminopyrimidine
Riboflavine	Vitamin B_2, Vitamin G, Lactoflavin	6,7-dimethyl-9(d-ribityl)- -isoalloxazine
l-Pantothenic Acid	Vitamin B_3, Chick Antidermatitis Factor	N-(α, γ-dihydroxy-β,β - -dimethylbutyryl)-β-alanine
Pyridoxine	Vitamin B_6, Adermin, Rat Antidermatitis Factor	2-methyl-3-hydroxy-4,5-di- -(hydroxymethyl)-pyridine
Nicotinic Acid	Niacin, P-P Factor	pyridine-3-carboxylic acid
Biotin	Vitamin H, Coenzyme R	2-keto-3,4-imadazilido-2- -tetrahydrothiophenevaleric acid
Inositol	Bios I	1:2:3:4:5:6-hexa- -hydroxycyclohexane
p-Aminobenzoic Acid		
Choline	Bilineurine, Sincaline, Amanitine	(β-hydroxyethyl) trimethyl- -ammonium hydroxide
Folic acid	Pteroyl glutamic acid, Lactobacillus casei Factor	N[4{[(2-amino-4-hydroxy- -6-pteridyl)methyl] amino} benzoyl] glutamic acid
Vitamin B_{12}	Cyanocobalamine, Animal Protein Factor	Its full structure has not products are: 5,6-dimethylben unidentified fractions. Its com $C_{61-64}H_{88-92}N_{14}O_{18}PCo$.

Formula	Molecular Weight	Melting Point, °C	Physical Form and Colour
	337.27	252, with decompo--sition	colourless prisms, (very hygroscopic)
	376.36	282, with decompo--sition	orange-yellow needles
	219.13		pale yellow viscous oil
	169.18	160, with decompo--sition	colourless needles
	123.11	235.2	colourless needles
	243.30	230-232	long thin needles
	180.16	225-226	monoclinic
	137.13	187-188	colourless monoclinic prisms
	121.18		colourless viscous liquid
			thin yellow crystals
yet been worked out, but among the hydrolysis zimidazole, phosphoric acid, ammonia and 2 position is typified by the empirical formula	about 1300		dark red needles

is pushed towards a cell wall, its shape being greatly distorted. At sixty days of larval age the nuclei of the coelomic epithelial cells show acute stages of degeneration and their chromatin becomes clumped up at a corner of the nuclear membrane (Swamy and Sreenivasaya 1942). Thiamine deficient larvae of *Tribolium* have been shown to exhibit degenerative symptoms of their fat body, which consists of abnormally small cells with very low lipid content (Froebrich 1939).

Thiamine requirement has been demonstrated in numerous species of insects, in addition to other required water soluble factors. Therefore only a few illustrations can be given here: *Lucilia sericata* has been found to be unable to grow on sterile blood owing to lack of certain water soluble factors which are usually supplied by the bacterial flora of the larval diet. Supplementing the sterile blood with Marmite (1) allows the aseptic larvae to grow at a normal rate. Marmite, in turn, could be substituted by water soluble factors of the vitamin B complex; the heat labile factor among them was identified as thiamine (Hobson 1933).

Thiamine, like most of the other water soluble vitamins, manifests its effect as growth factor for all insects studied in this respect. *Drosophila melanogaster* (Van't Hoog 1935, 1936), *Tenebrio molitor* (Martin and Hare 1942) and *Aedes aegypti* (Golberg, De Meillon and Lavoipierre 1945) do not grow beyond the second larval instar when their diet is thiamine deficient. Omission of thiamine from a synthetic diet for *Blattella germanica* results in retarded growth and increased mortality, allowing only a few nymphs to reach maturity (Noland, Lilly and Baumann 1949). In addition, *Attagenus piceus* (Moore 1946), *Calliphora erythrocephala* (Sedee 1953), *Culex molestus* (Lichtenstein 1948), moths of the genus *Ephestia, Plodia interpunctella, Tineola biselliella* (Fraenkel and Blewett 1946) and *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943) have been found to require thiamine as growth factor. The wax moth *Galleria mellonella* contains certain symbionts which produce thiamine abundantly and enable the larvae to grow in a thiamine deficient diet (Rubinstein and Shekun 1941), but this insect cannot be reared for several generations on an autoclaved medium without supplementing it with thiamine (Haydak 1941). Growth of *Ornithodoros moubata* and oviposition of *Cimex lectularius* are inhibited when the nymphs are forced to take their blood meals from vitamin B deficient rats, whereas vitamin B_2 deficiency of rats has apparently no influence at all on those hemophagous species (De Meillon and Golberg 1947, De Meillon, Thorp and Hardy 1947). In the worker bee, development of the ovaries is markedly stimulated when the larval food contains thiamine, riboflavine, pyridoxine or pantothenic acid in addition to casein and honey (Pain 1951). Neo-

(1) A concentrated extract obtained from yeast by autolysis, providing the essential vitamins of the B group.

pyrithiamine strongly inhibits growth and causes high nymphal mortality when *Periplaneta americana* is fed this compound on a diet were it replaces thiamine at a molar ratio of 40:1. Obviously, any utilization of thiamine derived from intestinal synthesis is nullified at this level of antimetabolite (SIEBURTH and MCLAREN 1953).

The minimum amounts of thiamine required for optimal growth of *Aedes aegypti*, were found to be 0.8 μg/gm of larval diet (TRAGER and SUBBAROW 1938). *Drosophila melanogaster* (VAN'T HOOG 1935) and *Tribolium confusum* (FRAENKEL and BLEWETT 1947) grow at a normal rate when their diets contain a minimum of 0.1 and 1.0 μ g/gm, respectively.

B. Riboflavine.

In the form of riboflavine mononucleotide (as in the yellow enzyme) or riboflavine adenine dinucleotide (as in the diaphorases), riboflavine forms the prosthetic group of the flavine enzymes, which are active in the dehydrogenations of glucose monophosphate, malic acid and iso-citric acid.

Unfortunately, no literature is available on the histopathological manifestations of riboflavine deficiency in insects. The work which has been done concerns only gross effects of riboflavine deficiency on growth and metamorphosis. Thus, the following species have been found to require riboflavine as a growth factor: *Aedes aegypti* (TRAGER and SUBBAROW 1938, GOLBERG, DE MEILLON and LAVOIPIERRE 1945, TRAGER 1948), *Attagenus piceus* (MOORE 1946), *Blattella germanica* (NOLAND, LILLY and BAUMANN 1949), *Corcyra cephalonica* (SWAMY and SREENIVASAYA 1942, SARMA 1943), *Culex molestus* (LICHTENSTEIN 1948). *Drosophila melanogaster* (VAN'T HOOG 1935, TATUM 1941, SCHULTZ, LAWRENCE and NEWMEYER 1946), *Lucilia sericata* (KADNER and LA FLEUR 1952), *Ephestia, Plodia interpunctella* (FRAENKEL and BLEWETT 1946), *Periplaneta americana* (METCALF and PATTON 1942), *Ptinus tectus* (FRAENKEL and BLEWETT 1943), *Tenebrio molitor* (MARTIN and HARE 1942, FRAENKEL and BLEWETT 1943), *Tineola biselliella* (FRAENKEL and BLEWETT 1946) and *Tribolium confusum* (FROEBRICH 1939, FRAENKEL and BLEWETT 1943).

The delay in growth caused by the ommission of riboflavine from a test diet, varies considerably with the species of insect concerned. While in absence of riboflavine growth of *Ephestia elutella* is inhibited, it is only retarded in *Ephestia kuehniella* or *Tineola biselliella*. The larvae of the two last species grow very slowly; however, most of them complete their development on riboflavine deficient food (FRAENKEL and BLEWETT 1946). When iso-riboflavine (1) was substituted for riboflavine at an equimolecular ratio in a purified diet, the normal growth rate of *Periplaneta americana* was found to be unaffected (SIEBURTH and MCLAREN 1953). However, riboflavine has been shown previously

(1) A structural analogue of riboflavine reported to have antivitamin activity (EMERSON and TISHLER 1944).

to be essential for normal growth and survival of *Blattella germanica* (Noland, Lilly and Baumann 1949).The cockroaches fed with iso-riboflavine could have obtained sufficient riboflavine from sources other than their diet, especially as the experiments were not conducted under sterile conditions.

Riboflavine requirement has been determined quantitatively in a few species. Thus, *Aedes aegypti* (Trager and Subbarow 1938) and *Drosophila melanogaster* (Van't Hoog 1935, Tatum 1939) need for normal growth a minimum of 0.4 and 0.5 μg/ml diet, respectively. *Corcyra cephalonica* (Sarma 1943) and *Tribolium confusum* (Fraenkel and Blewett 1947) grow at a normal rate when their diets contain a minimum of 2.5 and 2.0 μg/gm, respectively.

C. Pantothenic acid.

Pantothenic acid is the main component of coenzyme A, which is involved in acetylation reactions, such as the condensation of the two-carbon derivative of pyruvic acid with oxalacetic acid to initiate the Krebs tricarboxylic acid cycle.

Pantothenic acid has been shown to be an essential growth factor for the following species of insects: *Aedes aegypti* (Subbarow and Trager 1940, Trager 1942, Golberg, De Meillon and Lavoipierre 1945), *Attagenus piceus* (Moore 1946), *Blattella germanica* (Noland, Lilly and Baumann 1949), *Calliphora erythrocephala* (Sedee 1953), *Culex molestus* (Lichtenstein 1948), *Drosophila melanogaster* (Tatum 1941), *Ephestia, Plodia interpunctella* (Fraenkel and Blewett 1946), *Lucilia sericata* (Kadner and La Fleur 1952), *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943), *Tenebrio molitor* (Martin and Hare 1942, Fraenkel and Blewett 1943), *Tineola biselliella* (Fraenkel and Blewett 1946) and *Tribolium confusum* (Fraenkel and Blewett 1943). The reduviid blood sucker *Triatoma infestans* fails to develop into fertile adults when calcium pantothenate is omitted from its artificial rearing medium consisting of serum, hematin and B vitamins (Nicolle and Lwoff 1944). When pantoyl taurine (1) or pantothenol (2) is substituted for pantothenic acid at an equimolecular ratio in a semi-synthetic diet, the growth rates of *Periplaneta americana* become exceedingly slow and 100 per cent mortality is observed by 90 days of nymphal age. Feeding the nymphs a massive dose of pantothenic acid reverses the effect of the antimetabolites: the roaches immediately start gaining in weight and mortality ceases (Sieburth and McLaren 1953).

The minimum amounts required for normal growth of *Aedes aegypti* (Trager 1942), *Drosophila melanogaster* (Tatum 1941) and *Tribolium confusum* (Fraenkel and Blewett 1947) were determined as 25 μg/ml, 1 μg/ml and 4 μg/gm of diet, respectively.

(1, 2) Both substances produce growth inhibition in pantothenic acid requiring microorganisms; this effect can be specifically counteracted by pantothenic acid (Barnett and Robinson 1942, Snell and Shive 1945).

D. Pyridoxine.

Pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate are the metabolically active forms in which this nutritional factor occurs in cells and tissues. Pyridoxal phosphate acts as a coenzyme for transaminases and an amino acid decarboxylase.

Rearing larvae of *Corcyra cephalonica* in the absence of pyridoxal causes abnormalities in their tryptophane metabolism. Increasing the dietary tryptophane from 0.001 per cent to 0.02 per cent to pyridoxine deficient larvae, results in the production of yellow excreta, whereas restituting pyridoxine to the larval diet restores the normal white colour of the excreta (SARMA 1945).

Qualitative pyridoxine requirement for growth has been demonstrated in *Calliphora erytrocephala* (SEDEE 1953), *Culex molestus* (LICHTENSTEIN 1948), *Ephestia, Plodia interpunctella* (FRAENKEL and BLEWETT 1946),*Lucilia sericata* (KADNER and LA FLEUR 1952), *Ptinus tectus* (FRAENKEL and BLEWETT 1943) and *Tenebrio molitor* (MARTIN and HARE 1942, FRAENKEL and BLEWETT 1943). Growth of *Tineola biselliella* is retarded on pyridoxine deficient food; however, most larvae complete their development (FRAENKEL and BLEWETT 1946). Addition of desoxypyridoxine (1) to a pyridoxine free diet has been shown to have no effect on the normal growth rate of *Periplaneta americana* (SIEBURTH and MCLAREN 1953); however, the closely related *Blattella germanica* definitely requires pyridoxine for growth and survival (NOLAND, LILLY and BAUMANN 1949). Development of *Drosophila melanogaster* is completely inhibited when excessive amounts of pyridoxine are fed to the larvae (HINTON, NOYES and ELLIS 1951).

The threshold concentration for normal growth amounts to 1.0 µg/ml of diet for *Drosophila melanogaster* (TATUM 1941) and 1.0 µg/gm of diet for *Tribolium confusum* (FRAENKEL and BLEWETT 1947).

E. Nicotinic acid.

Nicotinic acid forms a part of coenzyme I and coenzyme II, which participate in many of the reversible oxidation steps of the glucose utilization cycles and serve as hydrogen acceptors by being reduced at the 1,2 position of their pyridine ring. These reactions are catalyzed by flavine enzymes.

Nicotinic acid has been shown to be indispensable for growth of the following species: *Aedes aegypti* (SUBBAROW and TRAGER 1940, TRAGER 1948), *Calliphora erythrocephala* (SEDEE 1953), *Culex molestus* (LICHTENSTEIN 1948), *Ephestia elutella, Ephestia kuehniella, Plodia interpunctella, Tineola biselliella* (FRAENKEL and BLEWETT 1946),*Lucilia sericata* (KADNER and LA FLEUR 1952)

(1) Its administration to rats and mice causes severe pyridoxine deficiency (STOERK 1950).

and *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943). Addition of nicotinic acid to an artificial medium of *Triatoma infestans* shortens the intervals between molting (Lwoff and Nicolle 1944). In *Blattella germanica* the omission of nicotinic acid from its diet causes extremely slow growth and death before reaching maturity (Noland, Lilly and Baumann 1949).

Tribolium confusum has been used to investigate the specificity of nicotinic acid as a nutritional factor. The larvae of this insect are able to utilize only a limited number of derivatives and analogues; e.g., methylnicotinate can replace nicotinic acid in its nutritional value, whereas niacinamide has only 50 per cent and ethylnicotinate 25 per cent of the nutritional value of nicotinic acid (Ellinger, Fraenkel and Abdel Kader 1947). Incorporating α-picolinic acid, 3-acetyl pyridine or pyridine-3-sulfonic acid instead of nicotinic acid in the diet of *Periplaneta americana* results in depressed growth rates and increased nymphal mortality. Pyridine-3-sulfonic acid appears to be the most active among the antimetabolites tested (Sieburth and McLaren 1953).

The nicotinic acid requirement of *Tribolium confusum* and *Tenebrio molitor* increases with increasing protein content of their diets and roughly doubles when the amount of dietary protein is doubled. For *Tribolium* the minimal dosage for optimal growth was determined as 4 μg/gm diet containing 5 per cent casein and 64 μg/gm diet containing 75 per cent casein. For *Tenebrio* the respective values are 8 μg/gm diet containing 5 per cent casein and 128 μg/gm diet containing 50 per cent casein. This suggests that nicotinic acid may be required in the process of utilization of protein for energy (Fraenkel and Stern 1951). The minimum concentrations required for normal growth of *Drosophila melanogaster* (Tatum 1939) and *Galleria mellonella* (Rubinstein and Shekun 1941) are 1.0 μg and 0.1 μg/gm of diet, respectively.

F. Choline.

Choline is used in the synthesis of acetylcholine and phospholipids. Its methyl groups play an important role in intermediary metabolism since they are concerned in the process of transmethylation, by which methyl groups are transferred from one metabolite to another.

Choline has been shown as an important growth factor for *Aedes aegypti* (Trager 1948), *Attagenus piceus* (Moore 1946), *Culex molestus* (Lichtenstein 1948), *Drosophila melanogaster* (Schultz, Lawrence and Newmeyer 1946, Hinton, Noyes and Ellis 1951), *Ephestia, Plodia interpunctella* (Fraenkel and Blewett 1946), *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943), *Pyrausta nubilalis* (Beck, Lilly and Staufer 1950) and *Tenebrio molitor* (Fraenkel, Blewett and Coles 1950). *Calliphora erythrocephala* contain at an average 0.57 mg nitrogen per larva when reared aseptically for 7 days on a choline deficient diet, whereas on a complete diet the corresponding value amounts to 2.58 mg nitrogen per larva (Sedee 1953). Larvae of *Lasioderma serricorne* were

found to contain symbionts capable of synthesizing choline abundantly; however, under sterile rearing conditions choline appears as the most critical accessory factor for this insect (Blewett and Fraenkel 1944).

The effect of choline deficiency upon growth differs remarkably among several species. For instance, omission of choline from a synthetic diet for *Tribolium confusum* causes only a slight decrease in the normal growth rate. *Ptinus tectus,* on the other hand, grows on a choline deficient diet about 1.6 times slower than on a complete diet. In addition, only 25 per cent of the larvae grown on the choline free diet pupate and give rise to normal adults (Fraenkel and Blewett 1943). The omission of choline from a synthetic diet for *Blattella germanica* results in extremely slow growth and death before maturity is reached (Noland, Lilly and Baumann 1949).

The replaceability of choline by other sources of methyl groups has been studied in *Blattella germanica.* Betaine can be utilized instead of choline, but aminoethanol, methionine or dimethylaminoethanol cannot replace choline. However, when a minimal amount of choline is added to these compounds, the growth rate of the cockroaches improves gradually with increasing number of available methyl groups (Noland and Baumann 1949).

Blattella germanica requires for normal growth at least 2000 μg choline/gm of diet (Noland, Lilly and Baumann 1949). This value shows that choline is required in much greater amounts than all the other accessory growth factors.

G. Pteroylglutamic (Folic) acid.

Pteroylglutamic acid appears to be a potent component of enzyme systems which are necessary for the synthesis and disposition of nucleic acids as they are needed in cell division. It is likely that pteroylglutamic acid functions as a coenzyme for ribonuclease which regulates cell multiplication, or perhaps is a precursor of ribonucleic acid for which it may supply essential structural elements. In any case, pteroylglutamic acid is required by many types of cells including neoplasms and many microorganisms. A number of analogues of pteroylglutamic acid have been found to exert a dual action on cell growth. Some of them support rapid cell division whereas others antagonize this process.

The following species of insects have been found to require folic acid: *Aedes aegypti* (Trager 1948), *Culex molestus* (Lichtenstein 1948), *Drosophila melanogaster* (Schultz, Lawrence and Newmeyer 1946), *Ephestia elutella, Ephestia kuehniella, Plodia interpunctella* and *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943, 1946). *Calliphora erythrocephala* contain at an average 1.83 mg nitrogen per larva after a growth period of seven days on a sterile diet deficient in folic acid, while when grown under identical conditions on a complete diet, the nitrogen content is 2.58 mg per larva (Sedee 1953). Thus it appears that folic acid is required for this insect as well. In the absence of folic acid

growth may be slowed as in the case of *Tribolium confusum* and *Ephestia* or cease entirely as in *Tenebrio molitor* (Fraenkel and Blewett 1947). The larva of *Lasioderma serricorne* contains symbionts which provide it with all the water soluble accessory factors; however, under sterile rearing conditions, folic acid seems to be an essential requirement (Blewett and Fraenkel 1944).

Larvae of *Aedes aegypti* grown in a folic acid free diet are not pigmented with the exception of the head. They are unable to disengage completely their third instar pelt and the majority die at this age. Addition of folic acid to their diet is required to bring about normal pupation (Golberg, De Meillon and Lavoipierre 1945). Similar symptoms of folic acid deficiency have been observed in the flour moth, *Ephestia kuehniella*: most of the larvae die and of the survivors none pupate before 8 weeks of age, whereas with folic acid present in the diet, complete pupation takes place between 5 and 6 weeks of age (Fraenkel and Blewett 1946). Thus, folic acid also seems to have some function in the process of metamorphosis. On the other hand, omission of folic acid from an otherwise complete diet apparently does not affect growth rate or emergence time of sterile *Lucilia sericata* (Kadner and La Fleur 1952). Likewise, growth of *Blattella germanica* seems to be even somewhat stimulated by the omission of folic acid from its diet (Noland, Lilly and Baumann 1949).

Interesting results have been obtained by studying the specificity of folic acid requirements in several insects. While xanthopterine has a growth promoting effect on *Ephestia kuehniella*, although in quantities 1000 times larger than the effective amount of folic acid, it has no effect at all on *Tenebrio molitor* (Fraenkel and Blewett 1947). This would suggest that *Ephestia*, unlike higher animals, might possess the dehydrolytic enzymes necessary for joining the pteridine portion of the folic acid molecule to p-aminobenzoic acid. It would have been of interest to extend the experiments with xanthopterine to other species. Synthetic folinic acid (citrovorum factor) and pteroyltriglutamic acid were found to be effective in replacing pteroylglutamic acid, but 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterine) inhibits the development of *Drosophila melanogaster*. Suboptimal concentrations of pteroylglutamic acid as low as 0.082 μg/ml of diet partly antagonize the inhibitory effect produced by 0.003 μg 4-aminopteroylglutamic acid per ml diet. However, at a concentration of 0.480 μg/ml of diet, pteroylglutamic acid completely releases the inhibition caused by 0.003 μg 4-aminopteroylglutamic acid per ml of diet. The antimetabolic ratio of several concentrations of 4-aminopteroylglutamic acid to permit 50 per cent pupation, suggests a constant relative inhibitory effect of 4-aminopteroylglutamic acid on pteroylglutamic acid for *Drosophila melanogaster* (Hinton 1952). 4-Aminopteroylglutamic acid incorporated in the diet of *Periplaneta americana* at an equimolecular ratio in place of pteroylglutamic acid depresses the growth rate of this insect to about half as much as when grown on its complete diet (Sieburth and McLaren 1953). Obviously *Drosophila* and

Periplaneta are unable to carry out oxidative deamination of 4-aminopteroylglutamic acid in position 4, as can be done by certain protozoa.

Folic acid requirement has been studied quantitatively in three species. The minimal concentration for normal growth of *Tribolium confusum* (Fraenkel and Blewett 1947) and *Tenebrio molitor* (Fraenkel, Blewett and Coles 1948) has been determined as 0.25 and 0.3 μg/gm of diet, respectively. The corresponding value for a wild strain of *Drosophila melanogaster* amounts to 6 μg/ml of diet, while the minimal amount necessary to support development beyond the larval stage was found to be as low as 0.0015-0.003 μg/ml of diet (Hinton 1952).

H. Biotin.

Although only slightly water soluble, biotin is included among the water soluble factors.

Biotin is believed to be needed for biological carbon dioxide fixation in decarboxylation and deamination reactions. It also catalyzes the biosynthesis of oleic acid.

Extensive work has been done on the function of biotin in the nutrition of the rice moth larva, *Corcyra cephalonica*. When supplied at dose levels of 2-10 μg/gm of diet, d-biotin stimulates growth of *Corcyra cephalonica* proportionally to the concentration in the diet. Biotin can be replaced by oleic or vaccenic acid at a concetration of 0.025 gm/gm of diet, allowing the larvae to grow, but at a higher concentration, both fatty acids are toxic to the larvae. Biotin free diets containing very small amounts of oleic acid cause high larval mortality. With successively increasing concentrations of dietary oleic acid more and more larvae survive; however, they are unable to pupate unless an ample amount of biotin is added to their diet. In vitro tests showed that tissues of biotin deficient larvae have less fat desaturating activity than tissues of normal larvae. The biotin deficient tissues also contain less saponifiable fat and sterols than normal tissues (Sankar and Sarma 1951). Larvae fed a biotin deficient diet excrete less uric acid than those grown on adequate diets (Sankar and Sarma 1952). Thus it may be concluded that biotin functions in increasing fat formation, especially that of unsaturated fatty acids, sterol storage and greater utilization of protein nitrogen and carbohydrates.

The insects investigated for biotin requirement can be divided among species for whom biotin is essential for growth and metamorphosis and species apparently not affected by biotin deficiency. *Calliphora erythrocephala* (Sedee 1953), *Culex molestus* (Lichtenstein 1948), *Ephestia kuehniella, Ephestia elutella, Plodia interpunctella* (Fraenkel and Blewett 1946), *Ptinus tectus* (Fraenkel and Blewett 1943) and *Tenebrio molitor* (Fraenkel, Blewett and Coles 1950) have been found to require biotin for growth and development. On the other hand, omission of biotin from the diet of *Blattella germanica* (Noland,

Lilly and Baumann 1949) and *Lucilia sericata* (Kadner and La Fleur 1952) apparently does not affect growth and metamorphosis. These observations however, may not be conclusive, since biotin requirement of the cockroaches was not determined under aseptic conditions and the larvae of *Lucilia* were reared aseptically, though only for one generation. The amount of some accessory factors carried over from the previous generation and available at the time of hatching from the egg may be sufficient for the insect to complete its metamorphosis, particularly when the essential factor is required in relatively small amounts like biotin. The effect of deficiency in an accessory factor may become apparent in some insects only after being reared aseptically for a few successive generations.

The specificity of the biotin requirement has been studied in several insects. For *Aedes aegypti* reared aseptically, replacing biotin by oleic acid, lecithin or related lipids, permits normal growth, but inhibits metamorphosis; pimelic acid, on the other hand, cannot substitute biotin at all (Trager 1948). *Tribolium confusum* can utilize dl-desthiobiotin or pimelic acid, but not dl-isodesthiobiotin, dl-Ψ-biotin or dl-isobiotin instead of d-biotin when reared under nonaseptic conditions (Rosenthal and Grob 1946). Biotin cannot be replaced by lecithin, but can be spared by citrulline in absence of arginine on a chemically defined medium for *Drosophila melanogaster* (Hinton, Noyes and Ellis 1951).

Biotin is active in extremely low concentrations. For instance, the larva of *Aedes aegypti* responds to 0.0006 γ g/ml of medium by accelerated growth, while the minimal concentration for normal growth amounts 0.05 μg/ml of medium (Trager and Subbarow 1938, Trager 1948). The growth rate of *Tribolium confusum* is markedly influenced by addition of 0.006 μg/gm of diet (Fraenkel and Blewett 1943), though this insect grows normally with a minimal concentration of 0.05 μg/gm (Fraenkel and Blewett 1947). The minimum concentration for normal growth of *Drosophila melanogaster* was determined as 0.015 μg/ml of diet (Schultz, Lawrence and Newmeyer 1946), but even very high concentrations of biotin are tolerated without any effect on normal growth (Hinton, Noyes and Ellis 1951).

(segue)

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 2 - Aprile 1955

NOTE E OSSERVAZIONI

REAZIONE ALLERGICA DA PUNTURA DI *MEGAPONERA FOETENS*

Dermatiti pomfoidi ed eczematoidi da punture di formiche dei generi *Mirmyca* e *Ponera* sono state già descritte e riportate nella letteratura.

Durante la mia attività in Somalia mi è accaduto non raramente di osservare elementi pomfoidi da punture di formiche di varie specie, localizzati esattamente nella circoscritta area di cute nella quale risiedevano le minuscole lesioni provocate dalle punture.

Solo recentemente però ho potuto osservare l'insorgenza di una imponente reazione allergica generalizzata in seguito a una puntura di una specie di formica identificata poi per la *Megaponera foetens*.

Tale specie, conosciuta in Somalia dagli europei come « formica cadaverica » e dai Somali denominata « girah », è assai comune in questo territorio ed in Africa Orientale in genere e molto nota per l'odore nauseante che emana.

Nella letteratura di cui dispongo non ho rintracciato alcun cenno su reazioni allergiche generalizzate provocate dalla puntura di questa formica. Per la conoscenza della nosografia del territorio, oltre che per la rarità e l'imponenza del quadro osservato, mi è apparso di interesse non trascurabile illustrare il caso clinico che riporterò.

La *Megaponera foetens* è una grossa formica di colore nero. Abitualmente scava il proprio nido in prossimità delle abitazioni umane con una spiccata predilezione per le immediate adiacenze degli ingressi e delle soglie delle abitazioni. Ha abitudini prevalentemente crepuscolari ed in parte notturne. Di sera, richiamata probabilmente dalla luce artificiale delle abitazioni, è facile ritrovarla nell'interno di queste.

Quando la si pesta, o quando più semplicemente le si passa vicino, si avverte un odore nauseante (cadaverico) del quale per varie ore rimangono impregnate le calzature di chi l'ha pestata, o di chi si trova a transitare, con vivo disappunto suo e di chi lo contorna.

Tale formica è intraprendente e predatrice. L'identificazione della specie è stata effettuata dal Prof. Giuseppe Scortecci (*) Direttore dell'Istituto di Zoologia dell'Università di Genova ,al quale ho a suo tempo inviato vari esemplari dell'imenottero anzidetto.

Caso clinico. — F. F. in B. di anni 34, di nazionalità italiana, residente al Villaggio Duca degli Abruzzi, atta a casa. Dati anamnestici remoti di nessun rilievo. In particolare non ha mai sofferto di manifestazioni allergiche di sorta. Non ricorda, nè esclude d'altra parte, di essere stata punta in passato da « formiche cadaveriche », nè da altre formiche. Alle ore 17,30 del giorno 7 Novembre 1954, sul calar del sole, mentre in prossimità dell'ingresso della propria abitazione accudiva alla sua bambina, veniva punta da una « formica cadaverica » alla regione retromalleolare esterna

---

(*) Mi è gradito esprimere i miei ringraziamenti al prof. G. Scortecci.

destra. Dopo una ventina di minuti dalla puntura la paziente accusò malessere generale e prurito generalizzato e notò la contemporanea insorgenza di una eruzione cutanea ad elementi pruriginosissimi. Allarmata richiese l'esame medico. A circa un'ora dalla puntura mi recai a domicilio della paziente che mi riferì quanto le era accaduto e mi segnalò che le intercorreva il ciclo mestruale.

E. O. — Soggetto di conformazione scheletrica superiore alla media, ben nutrito e ben sanguificato. Accusa prurito e malessere generale. Atteggiamento ansioso. In corrispondenza della regione retromalleolare esterna destra, al centro di un pomfo, sovrastante un vaso nettamente delineato, rilevai due minuscole lesioni puntiformi, distanti alcuni millimetri fra di loro. Sulla stessa regione la rete venosa superficiale era quanto mai appariscente. Sul volto della paziente e su tutta la restante superficie cutanea apparivano disseminati pomfi e chiazze eritematose, pruriginosissimi. Dermografismo spiccato in ogni area di ricerca. Iperestesia accentuata, sia spontanea che provocata, nella zona circostante le minuscole lesioni puntiformi. Temperatura 36,8. Polso 94 al m', molle, ritmico. Iperreflexia tendinea. Assenza del Babinski.

Decorso. — La terapia antiallergica prontamente instaurata apportò solo un temporaneo sollievo. Le manifestazioni tornarono ad esacerbarsi nella notte. Edemi, tipo edema di Quincke, comparvero alle palpebre, alle labbra, alle mani. La temperatura divenne subfebbrile. Tremori, vampe, insonnia e stato di depressione psichica. Le manifestazioni si attenuarono alquanto nella notte successiva per poi dileguare definitivamente dopo 48 ore circa dalla puntura. La terapia è stata sintomatica. Neoantergan per iniezione, cloruro di calcio per os, localmente impacchi di soluzione di permanganato di K all'1% sulla regione interessata dalla puntura.

La prima considerazione che sorge dalla disamina del quadro fenomenologico suddescritto è la rapidità di insorgenza, che pone in chiara evidenza il rapporto eziopatogenetico fra l'entrata in circolo della sostanza inoculata con la puntura, e l'insorgenza delle manifestazioni tossico-allergiche. Nel caso in esame si deve però annettere importanza anche al particolare momento fisiologico (periodo mestruale) che intercorreva nella paziente e che comportava un'accentuata iperreattività dell'organismo.

Si deve anche tener conto della superficialità dei vasi venosi nella zona di inoculazione; superficialità che nella paziente, come è stato rilevato, era appariscente quanto mai. Le vene superficiali delle regioni retromalleolari esterne decorrono, come si sa, dal basso in alto, verticalmente od obliquamente, nella tela sottocutanea: la più importante di esse è la vena saphena parva che decorre dietro il malleolo. E' probabile che al momento della puntura, le mandibole della formica (la presenza di due minuscole lesioni puntiformi esclude in certo qual modo che la puntura sia stata effettuata con l'aculeo del gastro di cui sono munite le femmine delle famiglie *Ponerinae* e *Dorylinae*, e che è rudimentale, o assente, nelle femmine di altre famiglie) siano penetrate nel lume vasale ponendo rapidamente in circolo la sostanza inoculata.

E' ovvio il legame fra tale modalità di penetrazione e la rapidità d'insorgenza e l'imponenza delle manifestazioni cliniche.

E' infine da prendere in esame la possibilità che in certe epoche dell'anno (epoca degli amori e della riproduzione in specie) la tossicità del veleno delle formiche sia notevolmente accresciuta. E' noto che il veleno delle formiche contiene acido formico (che tra l'altro è contenuto, come si sa, anche nei peli dell'ortica), ma non è improbabile che talune frazioni di tale veleno contengano altre sostanze. Tale ipotesi assume tanto maggior valore nei riguardi della *Megaponera foetens*, che si distingue già per singolari secrezioni dei propri apparati ghiandolari.

In conclusione nel nostro caso la puntura di *Megaponera foetens* ha provocato un'intossicazione nel cui quadro clinico, mentre sono state lievi ed a carattere prevalentemente neuro-tossico (tremori, etc.), le manifestazioni tossiche vere e proprie, spiccavano con marcata imponenza le manifestazioni a carattere allergico.

Egidio Lipparoni
S.A.I.S., Villabruzzi, Somalia

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 2 - Aprile 1955

RECENSIONI

BONNET H. e NÉVOT A.: *Travaux pratiques de bactériologie.* IV edizione. Masson, Paris 1954, 210 pagg., 6 tavv. a colori.

Come scrivono gli stessi AA. nella prefazione a questa edizione del loro manuale, esso è indirizzato particolarmente agli studenti di medicina.

Ha un carattere nettamente pratico e cerca di schematizzare il più possibile le ricerche batteriologiche fondamentali necessarie per la identificazione di un microbo. Per questo, dopo brevi pagine di indole generale (tassonomia, microscopia, mezzi di coltura), gli AA. passano in rassegna tutti i più importanti germi patogeni per l'uomo e di ognuno indicano e descrivono gli esami da eseguire per giungere a stabilire di quale agente morboso si tratti (esame microscopico diretto, isolamento, eventuale identificazione serologica, inoculazione in animali sensibili).

Al termine del manuale vi sono alcune brevi note sulle principali reazioni serologiche (deviazione del complemento, flocculazione, ecc.).

I. ARCHETTI

GIGANTE D. e RAGGIO - GUARNASCHELLI A. E.: *Il Laboratorio di analisi cliniche.* Abruzzini Editore, Roma 1955, XXXII + 840 pagg., 286 figg. in nero e a colori, 6 tavv. f. t., 25 fogli sciolti. L. 16.600.

Scopo degli AA. nell'accingersi alla compilazione della presente opera, come da essi stessi conclamato nelle « Premesse » in testa al volume, è stato quello di mettere a disposizione dei medici che svolgono la loro attività nei laboratori di analisi cliniche un testo eminentemente pratico che li indirizzasse nel loro lavoro. Partiti con tale intendimento, e nella costante giusta considerazione delle « limitazioni di ordine tecnico, economico e di tempo » logicamente legate alla natura privata del laboratorio di analisi, essi si sono preoccupati di limitare l'esposizione a quelle sole ricerche che hanno un campo di applicazione sufficientemente vasto nella medicina pratica, e di scegliere per ogni caso quelle metodiche che unissero in sè, per quanto possibile, i requisiti di precisione e di semplicità e rapidità di esecuzione.

La vastissima materia trattata è divisa, nell'ordine, nelle seguenti partizioni: *Parte generale*, concisa esposizione, ma chiara e completa, di tutte quelle nozioni di carattere generale basilari ed assolutamente indispensabili per la buona condotta, per la possibilità stessa del funzionamento anzi, di un laboratorio di analisi; *Chimica e Fisica*, la più ampia delle parti, in cui alle generalità di tecnica segue, per ordine alfabetico degli oggetti cui è rivolta la ricerca, la dettagliata esposizione delle varie metodiche analitiche, concludendosi con un paragrafo sulle moderne prove di funzionalità renale; *Ematologia*, *Batteriologia*, *Sierologia*, *Parassitologia*, compendio ciascuna della particolare metodologia inerente a ciascuna di queste branche scientifiche; una parte a sè è ancora dedicata alle *Prove biologiche*, mentre in altre parti sono raggruppati diversi argomenti: *Liquido cefalo - rachidiano, succo gastrico e duodenale; Latte, sperma, strisci vagivali; Urine, feci, composizione dei calcoli; Versamenti, escreato, cellule neoplastiche.* Un opportuno uso di titoli e sottotitoli consente una agevole e rapida ricerca dell'argomento il più particolare; ed in ciò si è anche facilitati da un preciso e dettagliato *Indice analitico* con cui si conclude il volume.

Pur nella sua voluta concisione l'esposizione è chiara, completa ed aggiornata. Aggiungeremo che essa non si limita alla arida descrizione delle tecniche, ma che per ciascuna di esse è giustamente fatto un sia pur breve riferimento al suo significato clinico, ciò che veramente vivifica la trattazione con il suo immediato richiamo alla importanza medica dell'indagine. Le parti sono ben commisurate alla loro importanza dal punto di vista analitico. In particolare ricorderemo che la parte parassitologica è divisa in « *Parassiti ematici* » è « *Parassiti intestinali* », questa con ulteriore partizione in due sottocapitoli uno dedicato ai protozoi e l'altro agli eminti; in due capitoletti a sè sono poi trattati gli « *Elminti intestinali rari e altri elminti* » e gli « *Acari* » (è doveroso osservare che proprio in questa *Parassitologia* sono sfuggite agli AA. diverse inesattezze di forma e di sostanza che rappresentano dei veri nei nella generale buona struttura dell'opera; auspichiamo che esse vengano corrette nelle prossime edizioni, così come che vengano sostituite alcune delle figure con altre più dimostrative e precise).

Ricca l'iconografia, quasi sempre di ottima fattura; meritevoli di particolare menzione le bellissime tavole fuori testo.

L'opera rappresenta in complesso un sostanziale contributo alla letteratura medica italiana, del quale dobbiamo essere grati ai due AA. Da essa certo trarranno assai giovamento tutti coloro che dedicano la propria attività al laboratorio di analisi cliniche. Una lode va fatta anche all'editore per la bella veste editoriale data al volume.

M. Ricci

RIVISTA DI PARASSITOLOGIA
Vol. XVI - N. 2 - Aprile 1955

NOTIZIE

COSTITUZIONE DELL'ASSOCIAZIONE MEDICI PROV.LI ITALIANI (A. M. P. I.)

Domenica 6 marzo, nella sala dell'Accademia Lancisiana (Ospedale di S. Spirito di Roma), cortesemente concessa, più di cento Medici Prov.li di tutte le Regioni hanno ufficialmente costituito l'*Associazione Medici Prov.li Italiani* (A.M.P.I.), la cui creazione era stata decisa a Venezia nel corso del 17° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana per l'Igiene.

Altri Medici Provinciali, impossibilitati di partecipare alla riunione, hanno inviato la propria adesione: nel corso dell'assemblea è stato approvato lo Statuto e sono state elette le cariche sociali (Presidente e Consiglio Direttivo):

— *Presidente:* Prof. Gaetano Del Vecchio, Ispettore Gen. Medico dell'A.C.I.S.;
— *Componenti:* (in ordine alfabetico).
— » Dr. Adalberto Bernabai, Medico Provinciale di IIª classe;
— » » Cesare Marenzi, Medico Prov.le di Iª classe - Bologna;
— » » Emanuele Traversa, Ispettore Gen. Medico, Medico Prov.le di Roma;
— » » Carlo Vetere, Medico Provinciale Aggiunto.

L'Associazione viene a colmare una grave lacuna organizzativa di una categoria igienistica, che costituisce il centro motore e coordinatore di tutto il settore pratico igienico sanitario della Nazione.

L'opera dell'A.M.P.I. non si limiterà soltanto alla difesa dei diritti della categoria, ma si estenderà a tutto il settore della preparazione culturale e scientifica dei Medici Prov.li, cercando d'incoraggiarne il perfezionamento ed operando perchè i funzionari medici dell'Amministrazione sanitaria possano efficacemente contribuire allo sviluppo dei servizi sanitari.

Il Presidente dell'Associazione, Prof. Gaetano Del Vecchio, ed i Membri del Consiglio Direttivo, Dott.ri Bernabai, Traversa e Vetere sono stati ricevuti, lunedì 7 marzo, da S. E. l'on. Alto Commissario Avv. Tiziano Tessitori e dal Segretario Gen.le dell'A.C.I.S., Ecc. Dr. Vincenti, che hanno avuto parole di simpatia per l'Associazione. Il 9 marzo anche S. E. l'Alto Commissario Aggiunto, on.le Dr. Beniamino De Maria ha ricevuto il Presidente ed il Consiglio Direttivo con cui ha avuto uno scambio di vedute sui problemi che interessano congiuntamente l'Amministrazione della Sanità Pubblica e l'A.M.P.I.

Il 7 marzo si è tenuta la prima riunione del Consiglio Direttivo che, tra l'altro, ha proceduto alla distribuzione delle cariche sociali previste dallo Statuto, come appresso:

a) Vice Presidente: Dr. Emanuele Traversa;
b) Cassiere - Tesoriere con funzioni di Segretario - Dr. Adalberto Bernabai.

Al Dr. Vetere Carlo è stato affidato il settore studi, legislazione e propaganda.

La Sede provvisoria dell'Associazione è presso l'abitazione del Dr. Bernabai, - Via Lucrino, 14 - Roma.

Quale organo Ufficiale è stata designata la Rivista « Igiene e Sanità Pubblica », la quale si è messa *gratuitamente* a disposizione dell'A.M.P.I.

Il 17 marzo si è riunito per la seconda volta il Consiglio Direttivo per trattare diversi argomenti all'o.d.g.

COSTITUZIONE DELLA SOCIETA' INTERNAZIONALE DI MICOLOGIA UMANA ED ANIMALE

La *Società Internazionale di Micologia Umana ed Animale* è stata fondata il 6 luglio 1954 da un gruppo di scienziati di 10 diverse nazioni convenuti a Parigi in occasione dell'8° Congresso Internazionale di Botanica.

Il Comitato della Società è costituito dai seguenti membri:

Presidente:	P. Redaelli	Milano
Vice Presidenti:	C. W. Emmons	Bethesda
	G. T. Ainsworth	Exeter
	P. Negroni	Buenos Aires
	G. Segrétain	Parigi
Segretario Generale:	R. Vanbreuseghem	Anversa

La Società si prefigge i seguenti scopi: riunire esperti interessati allo studio di miceti degli animali e dall'uomo; incoraggiare la formazione di gruppi regionali di tali esperti; organizzare riunioni dei membri della Società in occasione dei Congressi Internazionali; pubblicare, appena possibile, un bollettino sulla micologia umana ed animale.

Tutti coloro che desiderano divenire membri della Società Internazionale di Micologia Umana ed Animale, sono invitati ad inviare la loro domanda d'ammissione al Segretario Generale, precisando la loro qualifica, insieme alla lista delle loro pubblicazioni scientifiche. La sottoscrizione annuale è stata fissata in $ 3,00, da versare sul conto n. 133700 del Segretario Generale della Società, presso la Banca di Anversa, Antwerp, Belgio.

XVIII CONGRESSO NAZIONALE D'IGIENE

Il XVIII Congresso Nazionale d'Igiene si svolgerà a Napoli dal 19 al 22 ottobre c. a.

L'organizzazione del Congresso sarà curata da un Comitato ordinatore, presieduto dal Prof. Mario Mazzeo, Direttore dell'Istituto d'Igiene dell'Università di Napoli. Del Comitato fanno parte i Proff. Nicola Tecce e Alfredo Paoletti, ai quali è stato affidato lo svolgimento dei compiti di Segreteria.

I temi di relazione all'ordine del giorno sono i seguenti:

1) « Problemi igienico sanitari e piani regolatori » - Relatore il Prof. S. Cramarossa, Direttore Generale dei Servizi Medici presso l'ACIS;

2) « Problemi igienico sanitari dell'approvvigionamento del latte alimentare » - Relatore generale: Prof. C. F. Cerruti, Ufficiale Sanitario di Roma.

Relatori, ciascuno per la parte di sua competenza:

Prof. C. Arnaudi, Direttore dell'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica della Università di Milano;

Prof. E. Franco, Direttore del Reparto Medico - micrografico del Laboratorio provinciale d'igiene e profilassi di Milano;

Prof. G. Quagliariello, Direttore dell'Istituto di chimica biologica dell'Università di Napoli;

Prof. D. Nai, Direttore dell'Istituto di malattie infettive e polizia veterinaria dell'Università di Milano.

La Segreteria del Congresso è presso l'Istituto d'Igiene dell'Università - Via Luciano Armanni, 5 - Napoli.

Direttore responsabile: Dott. E. Mosna

Soc. An. Poligrafica Italiana Roma, Via della Guardiola, 22